

LUZIANE RAMOS SALES

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS  
DE BRÁCTEA E SEMENTE DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O.  
Kuntze

Dissertação submetida ao  
Programa de Ecossistemas  
Agrícolas e Naturais (PPGEAN) do  
Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina – Campus de Curitibanos.

Orientadora: Prof. Dra. Greicy M.  
M. Conterato  
Coorientadores: Prof. Dra. Adriana  
T. Itako  
Prof. Dr. Cristian Soldi

Curitibanos  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Sales, LUZIANE  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS  
DE BRÁCTEA E SEMENTE DE *Araucaria angustifolia*  
(Bertol.) O. Kuntze / LUZIANE Sales ; orientador,  
Greicy Michelle Marafiga Conterato, coorientador,  
Adriana Terume Itako, 2019.  
86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós  
Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais,  
Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2.  
Compostos bioativos,. 3. espécies reativas,. 4.  
extrato vegetal,. 5. fitopatógenos.. I. Marafiga  
Conterato, Greicy Michelle. II. Terume Itako,  
Adriana. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas  
Agrícolas e Naturais. IV. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS - PPGEAN

### Termo de aprovação

Potencial Antioxidante e Antifúngico de Extratos de Bráctea e Semente de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze

Por

**LUZIANE RAMOS SALES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Ciências Agrárias, no Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada pelos membros:

Dr(a). Greicy Michelle M. Conterato - UFSC  
Presidente e orientador

Dr. Joni Stolberg - UFSC

Dr(a). Sabrina Somacal - UFSM

Curitibanos, 26 de fevereiro de 2019.



Dedico esta conquista a minha família...

Ao meu Pai pelo exemplo de dedicação e carinho e pelo  
apoio em todos os momentos.  
Aos meus irmãos pelo incentivo, apoio irrestrito, suporte emocional,  
mas principalmente pelo o amor de vocês.  
Aos meus sobrinhos que são dadivas de Deus em minha vida.  
Que Deus esteja sempre com vocês!



## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o criador. Sua presença em mim foi sustento e me deu coragem para questionar a realidade e propor sempre um novo mundo de possibilidades. Agradeço por tudo que até aqui me aconteceu, pois tudo foi feito em nome de sua vontade.

Aos meus pais Domingos Sales e minha mãe Luzia Oliveira (*in memoriam*) por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. Que onde quer que esteja nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. Pai, meu amor eterno. À minha mãe, amor incondicional. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento tão especial.

Aos meus irmãos, Deildes Sales, Edna Santos, Sonia Montalvão, Jossaria Oliveira, Andreia Corgosinho, Alexsandra Bezerra, Adriana Sales, Thábeta da Silva, Isaac Sales, Ítalo Jonathas e Cinara Sales, que são modelos em que procuro me espelhar sempre. E pelo profundo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar até aqui e principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim. A vocês, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que conseguir conquistar e pela felicidade que tenho.

Aos meus sobrinhos Jaqueline Santos, Leonardo Santos, Fellipe Montalvão, Raffael Montalvão, Sofhia Montalvão, Deyvid Oliveira, Erick Oliveira, Geovanna da Silva, Andressa Corgosinho e Julia Corgosinho, Laura Montalvão, Davi Miguel e Bernardo da Silva. Cada um de vocês é um pedaço de mim, uma parte importante de minha alma, são muito amados e queridos a vocês devo momentos inesquecíveis. Como sempre falo, titia ama muito vocês.

Gratidão a minha Orientadora Prof<sup>ª</sup> Dra. Greicy Michelle Marafiga Conterato pela orientação, competência e por todo o conhecimento transmitido ao longo desses dois anos, por ter paciência e principalmente por ter acreditado na realização desse trabalho. Obrigada por acreditar que seria possível.

Aos meus Coorientadores Prof. Dr. Cristian Soldi e a Profa. Dra. Adriana Terumi Itako, pelo apoio e sabedoria que foram essenciais para que este trabalho fosse possível.

Gostaria também de agradecer aos professores do Mestrado, todos aqueles com os quais tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos durante as disciplinas ministradas.

Gostaria de agradecer também ao professor Prof. Dr. Joao Luis Coimbra (UNEB) que me ajudou, me incentivando a dar continuidade à minha vida acadêmica, meu muito obrigado querido professor, a quem tenho inestimável respeito e carinho.

E com toda certeza, agradecer aos meus colegas de classe do mestrado porque com vocês essa árdua caminhada foi mais leve, alegre, satisfatória principalmente por vocês, Virginia Muchanga, Bruna Ricardo, Cris Belicanta, Valdeir Lima, Gabriel Olivo, Simone Fontoura, Anna Meirelles, Aline Birehals, Alexandre Pires e Pedro Medrado. Vocês foram presentes que Deus me deu aqui, levarei nas minhas melhores lembranças.

Quando olhamos para o nosso lado e vemos alguém que está sempre presente, só podemos estar gratos. Agradeço às amigas que a UNEB me deu, Daiane, Camila e Mirian, melhor do que fazer novas amizades é conservar as antigas.

Quando você se cerca de pessoas que te inspiram e te incitam para cima, começamos a ver o mundo com outros olhos. Obrigada Dra. Andrea e Dr. Lívio por serem minha inspiração.

E por fim, agradecer a toda equipe do laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA) da UFSC, Campus de Curitibanos, do qual foi ótimo fazer parte, em especial, ao André L. F. Goetten, Gustavo Cechinel e Júlio Dallorsoleta, obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.  
(Madre Teresa de Calcutá)



## RESUMO

*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze é uma espécie nativa da mesorregião Serra Catarinense, cujas sementes (pinhões) são utilizadas como fonte de alimentos, porém suas cascas e a água de cozimento são descartadas. Além disso, toneladas de brácteas de araucária são descartadas anualmente, levando ao seu desperdício e gerando resíduos ao meio ambiente. A busca pela preservação do meio ambiente tem gerado a necessidade de métodos alternativos para o controle de fitopatógenos na agricultura, buscando-se assim, minimizar os impactos ambientais do uso de agrotóxicos, e da resistência dos fitopatógenos. Adicionalmente, a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é uma importante etapa preliminar na elucidação do potencial biológico de plantas, pois esses ensaios podem demonstrar tanto efeitos antioxidantes como pró-oxidantes, que podem estar relacionados com a atividade biológica avaliada. Este estudo quantificou os compostos fenólicos e flavonoides totais e avaliou a atividade antioxidante e antifúngica de extratos das brácteas e das cascas das sementes de araucária. O teor de compostos fenólicos totais foi maior no extrato aquoso das cascas do pinhão (EAP), mas o teor de flavonoides e a atividade antioxidante não diferiu do extrato aquoso de brácteas (EAB). Entre os extratos de brácteas, o teor de fenólicos e flavonoides totais foi maior no extrato hidroalcoólico (EHB), que por sua vez, obteve menor potencial antioxidante tipo SOD comparado ao extrato aquoso (EAB). O EHB apresentou maior potencial antifúngico (entre 80 - 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com 61% de inibição do crescimento micelial (em 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para o fitopatógeno *Sclerotium cepivorum*, contra 29 e 20% de inibição do EAB e EAP, respectivamente. Para o fungo *Sclerotium rolfsii*, a inibição do crescimento micelial pelos três extratos foi menor, sendo 15,83, 10,97 e 4,3% para o EHB, EAP e EAB, respectivamente, na concentração de 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nenhum dos extratos inibiu o crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados indicam o potencial das brácteas de araucária para o controle de fitopatógenos, em especial, do *S. cepivorum*, responsável por importantes perdas econômicas na cultura de alho. Essa atividade antifúngica especialmente demonstrada sob extração hidroalcoólica, atenta para a importância de se otimizar as condições de extração, a fim de melhor recuperar os compostos bioativos e o potencial antifúngico das brácteas.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos, espécies reativas, extrato vegetal, fitopatógenos.



## ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze is a native species from Serra Catarinense mesoregion, whose seeds (“pinhões”) are used as food sources, however its coats and the cooking water are discarded. Moreover, tons of araucaria bracts are discarded annually, leading to their loss and generating waste to the environment. The search for preservation of the environment has generated the need for alternative methods for the phytopathogens control, seeking to minimize the environmental impacts of the use of pesticides and the resistance of phytopathogens. In addition, the evaluation of *in vitro* antioxidant activity is an important preliminary step in elucidating the biological potential of plants, since these assays can demonstrate both antioxidant and pro-oxidant effects, which may be related to biological activity evaluated. This study has quantified the total phenolic and flavonoids content and has evaluated the antioxidant and antifungal activity of extracts of araucaria bracts and seed coats. The phenolic compound content was higher in the aqueous extract of seed coats (AEP), but the flavonoid content and the antioxidant activity did not differ from the aqueous extract of bracts (AEB). Between bract extracts, the phenolic and flavonoid content was higher in hydroalcoholic extract (HEB), which in turn, has shown a lower SOD-like antioxidant potential compared to AEB. HEB presented a greater antifungal potential (from 80 to 960  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) with 61% of inhibition of mycelial growth (at 960  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for the phytopathogen *Sclerotium cepivorum*, against 29 and 20% inhibition for AEB and AEP, respectively. For the *Sclerotium rolfii* fungus, the inhibition of mycelial growth by the three extracts was lower, being 15.83, 10.97 and 4.3% for HEB, AEP and AEB, respectively at the concentration of 960  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . None of the extracts inhibited the mycelial growth *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. The results indicate the potential of the araucaria bracts for the control of phytopathogens, especially *S. cepivorum*, which is responsible for important economic losses in the garlic crop. This antifungal activity is especially demonstrated under hydroalcoholic extraction, which considers the importance of optimizing the extraction conditions, in order to better recover the bioactive compounds and the antifungal potential of the bracts.

**Keywords:** Bioactive compounds, reactive species, plant extract, phytopathogens.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de solventes para a separação cromatográfica.....	45
Tabela 2. Área e a porcentagem relativa dos componentes dos extratos EAB e EAP. A área está relacionada à quantidade de cada componente fenólico que tem absorção em 276 nm.....	55
Tabela 3. Área e a porcentagem relativa dos componentes do extrato EHB. A área está relacionada à quantidade de cada componente fenólico que tem absorção em 276 nm.....	57



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Araucaria angustifolia</i> jovem, (A). <i>Araucaria angustifolia</i> adulta, (B).....	26
Figura 2. Pinhões de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	28
Figura 3. Principais espécies reativas e enzimas antioxidantes.....	31
Figura 4. Principais classes de compostos fenólicos.....	33
Figura 5. Estrutura geral dos flavonoides.....	34
Figura. 6. <i>Sclerotium cepivorum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	38
Figura 7. Fluxograma do preparo do extrato hidroalcoólico das brácteas.....	42
Figura 8. Fluxograma do preparo do extrato aquoso de pinhão e de brácteas.....	43
Figura 9. Quantificação de Compostos Bioativos. (A) Fenólicos totais e (B) Flavonoides nos extratos EAP, EAB e EHB de <i>A. angustifolia</i> . .....	52
Figura 10. Comparação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 276 nm entre os extratos EAB e EAP. .....	54
Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 276 nm para o EHB.....	56
Figura 12. Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP) nos extratos de <i>A. angustifolia</i> .....	60

Figura 13. Atividade sequestrante do radical DPPH (A) e a determinação da CE50 (B).....61

Figura 14. Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *A. angustifolia*, demonstrada como atividade removedora do ânion radical superóxido.....63

Figura 15. Porcentagem de inibição de crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* pelo extrato hidroalcoólico de brácteas (EHB).....65

Figura 16. Porcentagem inibição de crescimento micelial do *S. cepivorum* pelo extrato aquoso de brácteas (EAB)..... 66

Figura 17. Porcentagem inibição de crescimento micelial do *S. cepivorum* pelo extrato aquoso do pinhão (EAP)..... 66

Figura 18. Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* na concentração de 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  .....67

Figura 19. Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial do fungo *S. rolfsii* na concentração de 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ..... 67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX	Ascorbato peroxidase
BDA	Batata-dextrose-ágar
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EAB	Extrato aquoso de brácteas
EAP	Extrato aquoso do pinhão
EHB	Extrato hidroalcoólico de brácteas
ER	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FOM	Floresta ombrófila mista
FRAP	Potencial antioxidante redutor de ferro
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxila
HPLC	High performance liquid chromatography
CI50	Concentração que inibe 50% da oxidação da epinefrina
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
MIP	Manejo integrado de pragas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion radical superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
PIC	Porcentagem de inibição de crescimento
POD	Peroxidases
PPO	Polifenoloxidase
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>233</b>
1.1	OBJETIVOS .....	255
1.1.1	Objetivo geral .....	255
1.1.2	Objetivos específicos .....	255
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>266</b>
2.1	<i>Araucaria angustifolia</i> .....	266
2.2	ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES .....	29
2.3	ARAUCÁRIA COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	322
2.4	FITOPATÓGENOS E SEUS IMPACTOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA .....	36
2.5	EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS. ....	39
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>412</b>
3.1	COLETA DA PLANTA .....	422
3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	422
3.3	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....	43
3.3.1	Fenólicos totais .....	43
3.3.2	Flavonoides totais.....	444
3.4	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	44
3.4.1	Perfil cromatográfico dos extratos.....	44
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> .....	455
3.5.1	Potencial antioxidante redutor de ferro .....	45
3.5.2	Remoção do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.....	46
3.5.3	Proteção contra a oxidação da glutatona .....	47
3.5.4	Atividade removedora do radical hidroxila .....	477
3.5.5	Atividade removedora do radical superóxido.....	48

3.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	48
<b>3.6.1</b>	<b>Obtenção dos fungos.....</b>	<b>48</b>
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
4.1	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS .....	51
4.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE BRÁCTEAS E DE PINHÃO.....	533
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> .....	59
4.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	65
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A árvore *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma espécie subtropical conhecida popularmente como araucária. Sua ocorrência concentra-se principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo também encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Consiste na única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil (CARVALHO, 1994), fazendo parte da Floresta Ombrófila Mista (FOM), um dos mais exuberantes ecossistemas brasileiros. As sementes de *A. angustifolia*, conhecidas como pinhões, são popularmente utilizadas como fonte de alimentos, enquanto que as folhas, o nó-de-pinho e a casca do caule têm sido utilizados na medicina popular como antisséptico, no tratamento de distúrbios respiratórios, entre outras doenças (MARQUESINI, 1995).

Estudos recentes têm demonstrado a presença de compostos bioativos em diferentes partes da árvore de araucária, incluindo as brácteas (sementes não desenvolvidas), que são descartadas no meio ambiente por não terem uma finalidade específica. Entretanto, extratos obtidos das brácteas e cascas têm demonstrado propriedades antioxidantes, enquanto que o extrato obtido das folhas, atividade antiviral (FREITAS et al., 2009; SECCON, 2010). Assim, esses dados levam a crer que a araucária pode potencialmente apresentar propriedades benéficas ainda desconhecidas, em função da diversidade de compostos bioativos presentes nas diferentes partes das plantas.

Há uma crescente preocupação da sociedade com a contaminação dos alimentos pelos agrotóxicos, os quais se constituem nos agentes químicos utilizados no manejo das doenças agrícolas. Além da contaminação dos alimentos, da água e do solo, a ampla disseminação desses agentes tem gerado uma série de outros problemas ambientais, tais como a intoxicação de agricultores, a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras, o surgimento de doenças iatrogênicas, o desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (PERES; MOREIRA, 2003). Nesse contexto, os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas têm se apresentado nos últimos anos como interessantes alternativas ao uso de agrotóxicos para o controle de fitopatógenos, pois grande parte desses produtos possui atividade antifúngica, além de não causarem os efeitos prejudiciais característicos dos agrotóxicos à saúde humana e ambiental.

A atividade antifúngica dos extratos e óleos vegetais parece estar relacionada à ação de diversos compostos presentes em sua composição,

entre eles, os monoterpenos, os terpenóides e os compostos fenólicos (GILLES et al., 2010).

Os compostos fenólicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas e estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas contra os fitopatógenos. Esses mecanismos podem se basear na capacidade antioxidante desses compostos, na medida em que previnem a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resultam da interação do patógeno com a planta (BARBOSA et al., 2014). Ou ainda, podem ser responsáveis pela inativação de sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais (OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008).

Com base nas potencialidades da espécie vegetal araucária, na importância da agricultura como atividade econômica para a região de Curitiba (SC) e para o estado de Santa Catarina, bem como na necessidade de métodos alternativos que contribuam para uma agricultura mais sustentável, este estudo se propõe a avaliar as atividades antioxidante e antifúngica contra fitopatógenos, de extratos obtidos de brácteas e das cascas das sementes de araucária.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Quantificar os compostos bioativos e avaliar as atividades antioxidante e antifúngica dos extratos de brácteas e das cascas das sementes de araucária.

### 1.1.2 Objetivos específicos

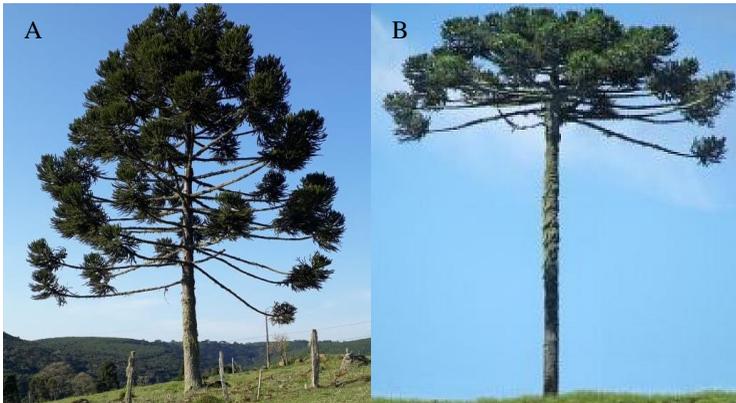
- Quantificar o teor de polifenóis totais e de flavonoides em extratos das brácteas e das cascas das sementes de araucária;
- Obter o perfil cromatográfico de compostos fenólicos nos extratos de brácteas e das cascas das sementes;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos das brácteas e das cascas das sementes;
- Investigar a atividade antifúngica dos extratos das brácteas e das cascas das sementes de araucária contra fungos fitopatogênicos *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Araucaria angustifolia*

Pertencente à família *Araucariaceae*, a espécie *Araucaria angustifolia* foi descrita por Bertoloni em 1820 como *Columbea angustifolia* Bert. Posteriormente foi redescrita por Richard em 1922 como *Araucaria brasiliana* Rich. e retificada por Otto Kuntze como *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze. No Brasil, a espécie *Araucaria angustifolia* (Fig. 1A e B) é popularmente conhecida por diversos nomes, como: pinheiro, pinheiro-araucária, pinheiro do Paraná ou simplesmente, araucária (CARVALHO, 1994).

Figura.1. *Araucaria angustifolia* jovem, (A). *Araucaria angustifolia* adulta, (B).



Fonte: Autora (2018).

A araucária é a única espécie de seu gênero com ocorrência natural no Brasil. Originalmente, as florestas de araucária cobriam uma área estimada de 185 mil km<sup>2</sup>, distribuídas nos estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%), Rio Grande do Sul (25%) e sul de São Paulo (3%), internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de altitude elevada (1%) (CARVALHO, 1994). No entanto, o intenso processo de exploração predatória da araucária no início do século XX fez com que as reservas naturais dessa espécie fossem limitadas a valores estimados entre 2 a 4% da área original (SIMÕES; LINO, 2002; SANTOS et al., 2015).

Especificamente no estado de Santa Catarina, o qual está totalmente inserido no domínio da Mata Atlântica, a Floresta Ombrófila Mista é a comunidade de principal ocorrência da araucária, sendo a formação florestal mais importante e de maior área no estado, distribuindo-se por quase todo o Planalto Catarinense (SCHÄFFER; PROCHNOW, 2002; KRUG; SANTOS, 2008).

A araucária se destaca dentre as demais espécies arbóreas por apresentar copa em um formato peculiar, grande porte, podendo atingir de 20 a 25 metros de altura, tronco geralmente cilíndrico reto, raras vezes ramificado, casca grossa e resinosa. As árvores jovens possuem copa cônica com os ramos primários cilíndricos, curvados para cima. Quando atinge a idade adulta, o dossel atinge o formato da taça devido à perda natural dos ramos inferiores (Fig. 1B), e os ramos secundários, também conhecidos por grimpas, alternos, agrupados no ápice dos ramos primários. As folhas possuem de três a seis centímetros de comprimento, são simples, agudíssimo-pungentes de coloração verde-escuro (REITZ, 1979; LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

As árvores dessa espécie são dioicas (há árvores femininas e masculinas), podendo ser monoica quando submetida a traumas ou doenças. Há predominância de pinheiros masculinos tanto em áreas de ocorrência natural, como em plantios. A floração feminina ocorre o ano todo. Por sua vez, a masculina ocorre de agosto a janeiro (BRDE, 2005). As flores são cilíndricas e alongadas, medindo de 10 a 22 cm de comprimento, por 2 a 5 cm de diâmetro, e compostas por escamas. As escamas arranjam-se na inflorescência masculina, em espiral. As escamas da base se abrem primeiro, deixando o pólen livre e à disposição do vento para ser transportado ao estróbilo feminino (REITZ; KLEIN, 1966).

A polinização é feita pelo vento e ocorre entre os meses de agosto e outubro. O pólen é transportado da flor masculina (mingote) até a flor feminina (pinha). As sementes (pinhões) desenvolvem-se a partir de óvulos nus, sem a presença de ovários, característica que classifica esta espécie como gimnosperma (GAMA, 2006).

A araucária produz anualmente cerca de 40 pinhas, chegando a atingir 200 pinhas por planta. Quando plantada, árvores isoladas iniciam a produção de pinhões entre 10 e 15 anos. Porém em povoamentos, a produção dá-se a partir de 20 anos. A maturação da pinha se caracteriza pelo término do seu desenvolvimento, e ocorre em diferentes épocas, dependendo da variedade e do local (CARVALHO, 1994). No Brasil, os pinhões são encontrados em maior quantidade de abril a junho (AMARANTE et al., 2007).

O pinhão (Figura 2), formado pela casca, embrião e endosperma, constitui a semente da araucária. Possui formato oblongo, alcançando de 3 a 8 cm de comprimento e pesando aproximadamente 8 g (CORDENUNSI et al., 2004).

Figura 2. Pinhões de *Araucaria angustifolia*. Em (A) pinhões fechados envoltos por casca e em (B), pinhões abertos com demonstração das diferentes partes.



Fonte: Autora (2018).

O pinhão apresenta cor marrom e contém grande quantidade de reservas nutritivas. Sua casca, em especial, é rica em taninos que são substâncias responsáveis ao menos por parte das atividades biológicas e farmacológicas das plantas das quais são isolados (CLIFFORD et al., 2000). Na indústria, o pinhão tem sido introduzido como alternativa ao uso de farinhas tradicionais na elaboração de produtos, porém a parte de maior interesse é o interior da semente que é fonte de proteínas, carboidratos e fibras (ALMEIDA, 2003).

O pinhão ainda pode ser consumido cozido em água ou diretamente no fogo, e também é usado para a produção de farinha, paçoca ou em granulados para pratos regionais como o popularmente conhecido entrevero, entre outros, sendo também uma ótima fonte de amido (CORDENUNSI et al., 2004; LEITE et al., 2008). Por ser importante fonte de carboidratos complexos como o amido (especialmente a amilose), o pinhão é uma fonte muito rica de energia e nutrientes, além de possuir baixo índice glicêmico (MUCCILLO, 2009). Do ponto de vista medicinal, os pinhões podem ser popularmente empregados no tratamento da azia, anemia e tumores (MARTINS, 2008).

No ano de 2017, a produção anual do pinhão ficou em torno de 3, 456 t, maior do que a quantidade de 2016, em que a produção anual chegou a 2,663 t (IBGE, 2017), com um crescimento de 793 t no ano de 2017. Isso corrobora a importância de planejamento para a economia advindo da comercialização do pinhão no estado de Santa Catarina. É importante mencionar, no entanto, que embora sua comercialização seja disciplinada pela Portaria Normativa DC nº20 de 27/09/1976, do Instituto Brasileiro Desenvolvimento Florestal, grande parte da venda ainda é clandestina (sem emissão de notas fiscais), o que dificulta a mensuração da magnitude deste mercado (BRDE, 2005).

Portanto, apesar de ser um produto de importância regional e com uma cadeia produtiva com importante expressividade, o comércio do pinhão ainda se caracteriza como uma atividade com elevado grau de informalidade (CERTI, 2012). Portanto, a realização de estudos acerca de seu potencial biológico também é parte das estratégias que visam a valorização da biodiversidade regional, bem como dos grupos envolvidos no manejo desta espécie nativa.

Ressalta-se ainda que, embora o pinhão e outras partes da araucária (casca, resina, nós, folhas e sementes) sejam utilizadas para diferentes aplicações na medicina popular, as brácteas (pinhões que não se desenvolveram) são descartadas como resíduos. No entanto, estudos têm demonstrado a presença de compostos bioativos nas brácteas, com potencial antioxidante *in vitro*, o que atenta, portanto, para seu potencial biológico (MICHELON et al., 2012; SOUZA et al., 2014; BRANCO et al., 2016).

## 2.2 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

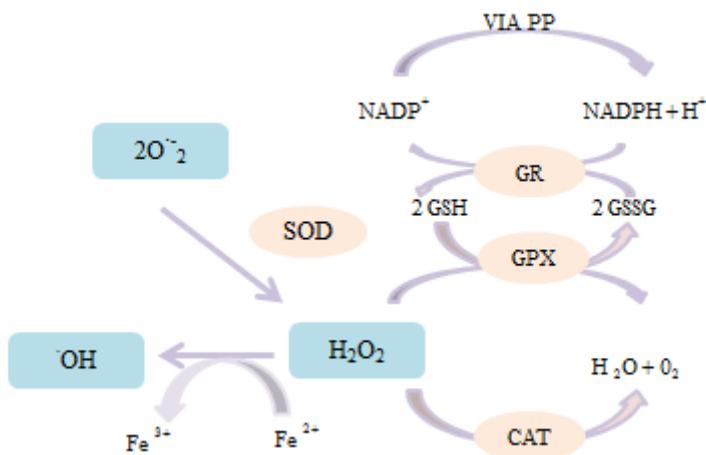
As espécies reativas (ER) consistem em átomos ou moléculas altamente reativas, uma vez que podem apresentar elétrons desemparelhados na última camada eletrônica ou mesmo quando não apresentam, podem dar origem a outras ER com maior reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE; 2007). Quando o elétron desemparelhado está centrado em um átomo de oxigênio, ou em um átomo de nitrogênio, as espécies reativas são denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas do nitrogênio (ERN), respectivamente. A fim de se tornarem estáveis, as EROs precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula ou átomo, sendo por isso, capazes de oxidar biomoléculas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE; 2007).

A fim de contrapor os efeitos nocivos das ER, as células vivas possuem um conjunto de compostos capazes de neutralizar sua ação danosa às biomoléculas celulares, os quais compõem o sistema de defesa antioxidante celular (VELLOSA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2007). Mais especificamente, um antioxidante pode reagir diretamente com as ER que contenham elétrons desemparelhados (espécies radicalares) e transformá-las em espécies mais estáveis (não radicalares). Os antioxidantes também podem agir indiretamente evitando a oxidação lipídica através de mecanismos envolvendo a quelação de metais, a supressão do oxigênio singlete, ou mesmo, a remoção das EROs (DECKER, 2002).

Os antioxidantes encontrados nos organismos vivos são basicamente divididos em dois grupos: os antioxidantes enzimáticos, compostos por enzimas capazes de remover diretamente as EROs, por convertê-las em compostos menos reativos ou não reativos; e os não enzimáticos, formados principalmente pelo tripeptídeo glutationa (GSH), cuja produção é endógena, bem como por algumas vitaminas (retinol, tocoferol e vitamina C) e compostos bioativos oriundos dos vegetais (flavonoides, antocianinas, carotenoides) (MOREIRA; SHAMI, 2004; HALLIWELL, 1995).

Os antioxidantes enzimáticos são representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), as quais removem diretamente as EROs produzidas em diferentes processos celulares, principalmente pela respiração celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nesse sentido, a SOD dismuta duas moléculas do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) convertendo-as em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que na sequência, é reduzido pela CAT e/ou pela GPx à água ( $H_2O$ ), essa última utilizando o tripeptídeo GSH como agente redutor do  $H_2O_2$  (NORDBERG; ARNÉR, 2001), conforme observado na figura 3. Uma vez que a GSH é convertida nessa reação à glutationa oxidada (GSSG), a enzima glutationa redutase (GR) utiliza NADPH produzido na via das pentoses fosfato (via PP) para regenerá-la à sua forma reduzida (GSH) (Figura 3).

Figura 3. Principais espécies reativas e enzimas antioxidantes. Via PP: via das pentoses fosfato; NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona; GSSG: glutatona reduzida; GPx: glutatona peroxidase; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion radical superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; <sup>•</sup>OH: radical hidroxila.



Fonte: Adaptado de Castillo (2018).

A ação conjunta dessas enzimas evita que um excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja convertido em radical hidroxila (<sup>•</sup>OH) na presença de ferro (Fe<sup>2+</sup>), via reação de Fenton. O radical <sup>•</sup>OH é o mais reativo das EROs e não existe defesa enzimática capaz de efetuar a sua remoção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Especificamente em plantas, o sistema antioxidante enzimático além de ser composto pela SOD, CAT, GPx e GR, é constituído pela ascorbato peroxidase (APX), peroxidases (POD) e polifenoloxidase (PPO) (KIM; KWAK, 2010). São importantes sistemas de defesa contra a produção excessiva de EROs nas células vegetais causada por estresse de origem biótica (ataque de patógenos, etc.) ou abiótica (radiação UV, estresse hídrico, etc). A APX, a CAT e as POD são as enzimas envolvidas na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas. Porém, a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela APX é acompanhada pela peroxidação do ácido ascórbico, enquanto a remoção pela POD, utiliza os compostos fenólicos como doadores de elétrons (LOCATO et al., 2010; DINAKAR et al., 2012). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é principalmente gerado nos cloroplastos (através da

fotorrespiração) de células fotossintéticas, e também nas mitocôndrias, cloroplastos e no citosol, através da dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  pela SOD. Da mesma forma que para os demais seres vivos aeróbicos, as enzimas responsáveis pela remoção do  $O_2^{\cdot -}$  (SOD) e do  $H_2O_2$  (APX, CAT e POD) em plantas, constituem o passo fundamental na prevenção dos danos oxidativos causados pelo excesso de  $\cdot OH$  (BHATTACHARJEE, 2010).

Diante do exposto, percebe-se que as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas agem em conjunto para manter o equilíbrio redox intracelular, evitando assim, a oxidação das biomoléculas tanto em plantas como em animais. Porém, quando essas defesas falham em remover adequadamente as EROS, ocorre o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento excessivo das concentrações intracelulares de EROs, bem como pelo alto grau de oxidação das biomoléculas celulares. O aumento, em especial, dos níveis do radical  $\cdot OH$  leva à mutações no DNA, desnaturação de proteínas e iniciação da peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2007). Caso não seja limitado, o estresse oxidativo pode resultar em morte celular por apoptose e conseqüentemente no aparecimento de patologias ou mesmo, na morte do organismo (FRIDOVICH, 1999; MIGUEL; CORDERO, 2012).

### 2.3 ARAUCÁRIA COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

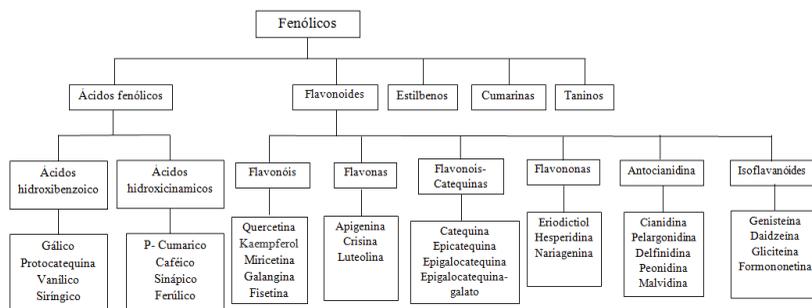
Os compostos bioativos são, em sua maioria, metabólitos secundários das plantas. Geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou contra as agressões de insetos ou patógenos. Quando em contato com o organismo humano, esses compostos exercem variadas funções, como atividade antioxidante, modulação de enzimas de detoxificação, estimulação do sistema imune, modulação do metabolismo hormonal, e atividade antibacteriana e antiviral (CARRATU; SANZINI, 2005).

Entre os compostos bioativos mais importantes, estão os compostos fenólicos, capazes de atuar como antioxidantes, inibindo ou interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelas ER (PODSEDEK, 2007). Em termos químicos, os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas ligados (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Quando possuem dois ou mais anéis aromáticos são denominados de polifenóis. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligada à

açúcares (glicosídeos) e à proteínas. As classes de compostos fenólicos mais largamente distribuídas na natureza são representadas pelos **flavonoides**, cuja divisão está baseada na conexão do anel aromático B com o anel heterocíclico e subdividem-se em flavonóis, flavonas, flavononas, flavan-3-óis, isoflavonas e antocianidinas) e os **não flavonoides**, representados pelos **ácidos fenólicos** (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados), estilbenos, cumarinas, taninos e ligninas (KING; YOUNG, 1999). Os flavonoides estão presentes na maioria das plantas, onde se concentram em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001).

As estruturas químicas das principais classes de compostos fenólicos encontradas na natureza, incluindo as subclassificações da classe dos flavonoides estão demonstradas na Figura 4 (KOEHNLEIN et al., 2012).

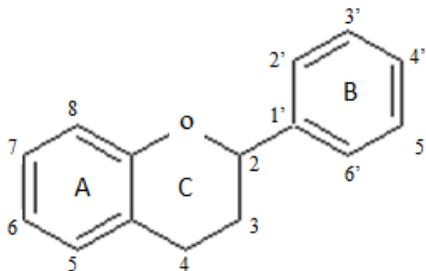
Figura 4. Principais classes de compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de LIU (2004).

A estrutura química básica dos flavonoides é conhecida como flavilium e consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), sendo que os benzenos aparecem interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição 3 carrega um grupo fenila (DORNAS et al. 2010) (Figura 5).

Figura 5. Estrutura geral dos flavonoides.



Fonte: Autora (2019).

Variações quantitativas e qualitativas na composição desses constituintes podem ocorrer em função de fatores intrínsecos (cultivar, variedade, estágio de maturação) e extrínsecos (condições climáticas e edáficas). Por sua vez, a eficácia da ação antioxidante depende da concentração desses fitoquímicos nas diferentes partes do vegetal (REYNERSTON et al. 2008; MELO et al., 2008).

A araucária também tem se apresentado como uma fonte rica em flavonoides, vitaminas e em outros compostos bioativos. Extratos metanólicos dos pinhões apresentaram-se como fonte de minerais, compostos fenólicos e flavonoides, principalmente rutina, catequina e epicatequina. Adicionalmente, estudos enfatizam que o cozimento do pinhão é favorável aos seus compostos bioativos pois eles migram da casca para a semente, quando esta é submetida a tratamentos térmicos (CORDENUNSI et al., 2004).

Os flavonoides catequina, quercetina, epicatequina, apigenina e rutina foram identificados como compostos majoritários em extratos aquosos de brácteas da araucária (MICHELON et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

A partir da casca da planta adulta da araucária, foram isolados os compostos p-hidróxibenzaldeído, coniferaldeído, vanilina, as isoflavonas cabrevina e irisolidona, e os lignoides pinoresinol, eudesmina e lariciresinol (FONSECA et al., 2000). Um resumo dos principais compostos bioativos encontrados em diferentes partes da araucária por outros autores é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Principais compostos bioativos encontrados em diferentes partes de *A. angustifolia*.

<b>Partes da <i>A. angustifolia</i></b>	<b>Compostos bioativos encontrados</b>	<b>Referências</b>
<b>Brácteas</b>	Ácido quínico, 4'-metoxitectorigenina, 3-dihidroquercetina glicosídeo e amentoflavona 4'4'', 7, 7''-tetrametiléter	Souza et al. (2014)
	<b>Flavonoides</b> Catequina, Epicatequina Rutina, Apigenina e Quercetina	Michelon et al. (2012) Souza et al. (2014)
	<b>Ácidos Fenólicos</b> Ácido gálico	Koehnlein et al. (2012) Cordenunsi et al. (2004)
<b>Semente (Pinhão)</b>	<b>Flavonoides</b> Catequina, Epicatequina Quercetina	Cordenunsi et al. (2004)
	Taninos Monoterpenos	Raja et al. (2001)
	<b>Flavonoides</b> Isoflavona, cabrevina Irisolidona, Quercetina 3-O-glicosídeo, Epicatequina	Fonseca et al. (2000) Santos et al. (2018)
<b>Casca</b>	<b>Ácidos Fenólicos</b> Ácido ferúlico, Ácido protocatecóico	Santos et al. (2018)

Fonte: Autora (2018).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devido às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de espécies reativas, quelando o oxigênio tripleto e singleto ou decompondo peróxidos (ZHENG; WANG, 2001).

A presença desses compostos bioativos pode estar relacionada tanto às diversas aplicações no uso popular do pinhão e demais partes da araucária, quanto às propriedades biológicas demonstradas em estudos científicos. Popularmente, o pinhão é usado no combate à azia, anemia e debilidade do organismo. As folhas cozidas são usadas no combate à anemia e tumores provocados por distúrbios linfáticos (FRANCO; FONTANA, 1997). A infusão da casca mergulhada em álcool é empregada para tratar herpes zoster e reumatismo, varizes e distensões musculares (CARVALHO, 1994).

Os extratos etanólico e aquoso obtido da casca da árvore apresentaram atividade antioxidante direta e habilidade em prevenir a citotoxicidade induzida pelo  $H_2O_2$  em células de fibroblastos de ratos. Além disso, inibiu a lipoperoxidação induzida por radicais ascorbil e radiação ultravioleta (UV) em lipossomos de fosfatidilcolina de soja e em microsossomos de ratos (SECCON, 2010). Recentemente, o potencial antitumoral da araucária em linhagens de células tumorais humanas tem sido amplamente elucidado (BRANCO et al., 2015; BRANCO et al., 2018) e um estudo demonstrou o potencial anti-obesidade de um extrato rico em taninos, em camundongos (SAMANTA et al., 2004).

Baseado nos estudos citados percebe-se que os poucos estudos acerca do potencial biológico da araucária estão predominantemente focados na caracterização de seus compostos bioativos e na prevenção e/ou tratamento de doenças humanas. Por isso, estudos que busquem elucidar novas e potenciais aplicações da araucária em outros setores também essenciais para a economia e desenvolvimento do país (como a agricultura) e que ao mesmo tempo, busquem a sustentabilidade ambiental, são de grande relevância.

## 2.4 FITOPATÓGENOS E SEUS IMPACTOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

Com 24% da sua economia baseada na agropecuária, a região da cidade de Curitiba é a principal produtora de alho do estado, concentrando a maior parte das lavouras catarinenses, e a segunda maior de maçã, com destaque também no cultivo de batata-semente (BRASIL,

2010). Destaca-se ainda que 76% do total de alho produzido em Santa Catarina, provém deste território (EPAGRI, 2016). Além disso, também são cultivadas no território Planalto Catarinense, as culturas de trigo, cebola, fumo e feijão, sendo que para esta última, o município de Curitiba detém a produção de 6.700 ha do total de 28.360 ha de plantação dessa cultura na região. Juntamente com a soja, milho e alho, essas culturas somam 98,5% do valor da produção de lavouras temporárias. Apesar desses avanços, a região do Planalto Catarinense tem ainda uma baixa participação na formação bruta da produção agropecuária estadual (BRASIL, 2010).

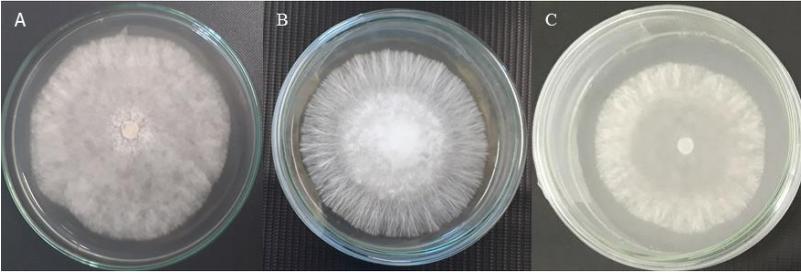
Entre os diversos fatores que podem afetar a produtividade agrícola de uma região, estão as doenças causadas por organismos denominados fitopatógenos. Esses consistem em microrganismos (vírus, fungos, protozoários, bactérias, etc) com capacidade de interferir no metabolismo da planta, seja por secreção de substâncias, seja pela absorção de seus nutrientes, a fim de utilizá-los para o seu próprio crescimento e metabolismo (KIMATI, 2005).

Os fatores que influenciam a distribuição e a frequência do aparecimento de tais agentes e as doenças por eles desencadeadas, são as variações nas condições ecológicas, agroclimáticas e socioeconômicas de determinadas áreas de cultivo, que podem definir o quadro de ocorrência das populações de agentes fitopatogênicos (PENA, 2011).

Os fungos são definidos como organismos eucariontes, com parede celular rígida, desprovidos de clorofila, sendo conhecidos como bolores, leveduras e cogumelos (AMABIS; MARTHO, 2004). Por um lado, esses microrganismos são considerados um dos agentes mais importantes no processo de degradação da matéria orgânica, e estão diretamente relacionados com a quantidade de biomassa produzida em um sistema agrícola (ESPOSITO, AZEVEDO; 2004), podendo também atuar em intemperismos e associações importantes com outros organismos (MONCALVO, 1997). Em contrapartida, muitos fungos são fitopatogênicos, e estão entre os principais agentes causadores de doenças que afetam a produção agrícola, podendo afetar toda a produção e conseqüentemente, causar importantes prejuízos econômicos ao país (HORBACH et al., 2011).

Entre as diversas espécies de fungos fitopatogênicos, foram objeto de estudo deste trabalho, as seguintes espécies *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotium cepivorum* (Figura 6).

Figura 6. *Sclerotium cepivorum* (A), *Sclerotium rolfsii* (B) e *Sclerotinia sclerotiorum* (C).



Fonte: Autora (2018).

O fungo *S. sclerotiorum* consiste no agente causador do mofo branco. O fungo possui hifas hialinas, sendo que seu micélio pode apresentar-se branco ou pouco mais tonalizado. Sua sobrevivência em longo prazo ocorre através de escleródios, estruturas duras pigmentadas, compostas por multihifas, que podem permanecer viáveis durante longos períodos aguardando as condições ideais (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). A disseminação ocorre principalmente pela semente, sendo de difícil erradicação depois de este fungo ser introduzido na área de cultivo (YANG et al., 1998).

A doença do mofo branco apresenta importante impacto econômico no Brasil, não só pelos danos que causa às culturas hospedeiras, como por exemplo, a soja, cujas perdas são estimadas em 30% ou mais, como também pela atuação subsequente em cultivos futuros desta e de outras espécies de interesse econômico (STEFANELO, 2015). A doença apresenta grande importância em função de sua severidade e das perdas provocadas pelo fungo *S. sclerotiorum* que por ser extremamente polífago, tem a habilidade de infectar mais de 450 espécies vegetais (DEMANTE, 2010). Entre elas, as culturas de soja, canola, batata, algodão, tomate, girassol e feijão. As perdas anuais devido a este fungo atingem milhões de dólares, causando grandes prejuízos no Brasil (STEADMAN; BOLAND, 2005; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

*S. rolfsii*, conhecido por mofo cinzento, é um importante fitopatógeno habitante do solo, sendo responsável por causar sintomas de podridão de raízes, do colo, de bulbos e frutos, causando murcha, tombamento de plântulas e podridões. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 200 espécies de plantas, pertencentes a quase 100 famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas do país com predominância nos estados de MG, PE, SP, DF, BA, SC, TO, ES, PB,

RS (SCHURT, 2006). Sua disseminação na área de plantio ocorre principalmente através da água de irrigação e de solos infectados, mudas infectadas e sementes contaminadas com esclerócios (AGRIOS, 2005)

*S. cepivorum* Berkeley é o agente causal da doença denominada de podridão branca que ataca as aliáceas, sendo mais importante na cultura do alho (*Allium sativum*) e da cebola (*Allium cepa*) (BECKER, 2004). Caracteriza-se por ser um fungo imperfeito, ou seja, a forma assexuada cuja forma perfeita ainda não foi descrita. O fungo sobrevive no solo ou em restos culturais por mais de oito anos, na forma de escleródios. Os escleródios são a única estrutura reprodutiva conhecida desse fungo, pois o mesmo aparentemente não produz esporos. Esses por sua vez, são esféricos, negros com diâmetro variando de 200 a 500 µm (BECKER, 2004).

Em épocas frias e de umidade elevada, na presença de plantas como alho ou cebola, os escleródios germinam podendo infectar a base de bulbilhos (alho) e bulbos (cebola), causando a podridão branca. As referências sobre a biologia de sobrevivência de escleródios de *S. cepivorum* citam que esses podem sobreviver no solo por vários anos (HARPER, 2001).

A podridão branca é uma das doenças mais importantes e cosmopolitas do alho (*A. sativum*) e da cebola (*A. cepa*), podendo ocorrer em outras aliáceas, como o alho poró (*A. ampeloprasum*) e a cebolinha (*Allium fistulosum*). A doença já é conhecida há muito tempo em algumas áreas produtoras de alho e cebola do Sul e do Sudeste do Brasil, entretanto, tem aparecido em regiões onde o cultivo do alho é mais recente em relação às regiões Sul e do Sudeste do Brasil (ZAMBOLIM; JACCOUD FILHO, 2000).

## 2.5 EXTRATOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.

A criação de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas tem por finalidade oferecer alternativas para se diminuir a dependência dos defensivos agrícolas. Neste sentido, essas novas alternativas buscam contribuir para a prática de uma agricultura mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade moderna (BETTIOL, 2006). Assim, sistemas de cultivo menos dependentes do uso de agrotóxicos têm sido desenvolvidos, e dessa forma um fator indispensável para a agricultura sustentável é o controle alternativo de doenças de plantas provocadas por fungos fitopatogênicos.

O Brasil detém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, o que representa um valor inestimável para os diversos segmentos da economia do país, incluindo a agricultura, uma vez que essa possivelmente se beneficiaria das atividades biológicas ainda desconhecidas de uma diversidade de plantas nativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Dentro deste contexto, os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas têm se apresentado nos últimos anos como interessantes alternativas ao uso de agrotóxicos para o controle de fitopatógenos, pois grande parte desses produtos possui algum grau de atividade antimicrobiana, além de não causarem os efeitos prejudiciais característicos dos agrotóxicos à saúde humana e ambiental. Essa atividade parece ser atribuída à ação de diversos compostos presentes em sua composição, entre elas, os monoterpenos, os terpenóides e os compostos fenólicos (McGRATH, 2004; GILLES et al., 2010).

Além das funções biológicas relacionadas aos mecanismos bioquímicos de defesa das plantas contra a invasão de patógenos, os compostos fenólicos têm demonstrado atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (NICHOLSON, 1995), com destaque para o ácido clorogênico, ácido protocatecólico, catecol, floridizina e arbutina, os quais têm sido associados ao desenvolvimento de resistência a doenças em plantas. Entre os mecanismos associados à atividade antifúngica descrita para esses compostos, estão às inibições da germinação de esporos, do crescimento micelial, bem como da atividade das enzimas microbianas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995), cuja alteração interfere na produção de energia e na síntese de componentes estruturais desses microrganismos (OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008).

Adicionalmente, condições de estresse biótico em plantas, como o ataque por fitopatógenos (fungos, vírus e bactérias), podem induzir ao aumento da produção de EROs, levando ao estresse oxidativo. Como consequência, poderá haver danos às estruturas celulares e inclusive, a morte da planta hospedeira, dependendo da sua sensibilidade e dos seus mecanismos de defesa (BARBOSA et al., 2014), sendo a peroxidação lipídica uma das principais alterações oxidativas resultantes da interação entre plantas e patógenos (ADAM et al., 1995).

Com base no exposto, os extratos vegetais despontam como alternativas potencialmente úteis no controle fitossanitário, não só por agir na prevenção e/ou tratamento das doenças causadas por fitopatógenos, mas possivelmente, por prevenir ou atenuar os danos oxidativos resultantes da interação do patógeno com a planta hospedeira,

preservando assim, a sua integridade e aumentando as suas chances de sobrevivência.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA DA PLANTA

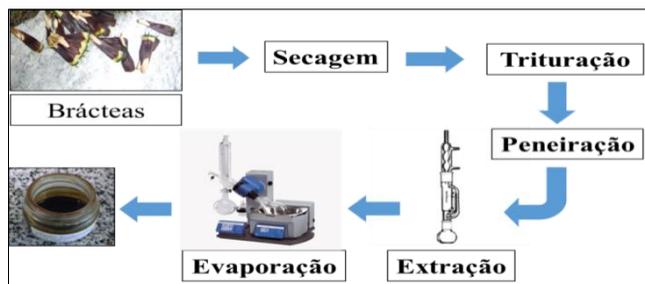
As sementes e brácteas de diferentes exemplares da árvore *A. angustifolia* foram coletadas em Curitiba – SC, Brasil 27°18'40.1"S 50°38'42.0"N.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para avaliação da atividade antioxidante e antifúngica, foram preparados os extratos hidroalcoólico das brácteas (EHB) e o extrato aquoso das cascas do pinhão (EAP) e das brácteas (EAB). Os procedimentos de extração foram realizados no laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitiba. Para o preparo do EHB, foi seguido o procedimento descrito a seguir (Figura 7).

O método de extração foi baseado no protocolo de Antunes, Freitas e Royo (2016) com modificações. Inicialmente, as brácteas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente trituradas e peneiradas, obtendo-se um material com granulometria entre 1,20 mm e 2,20 mm. Este material foi então submetido à extração em equipamento soxhlet, utilizando álcool 93,6 °GL (92 INPM) como solvente, por um período de 6 horas. Logo após o material foi evaporado em um evaporador rotatório por 50 minutos, à temperatura de 50°C obtendo-se ao final desse procedimento, o EHB das brácteas.

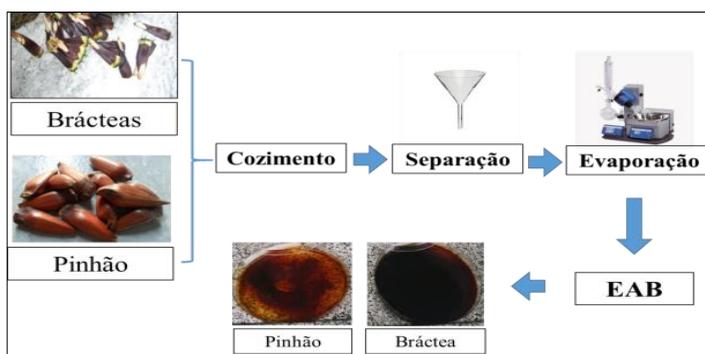
Figura 7. Fluxograma do preparo do extrato hidroalcoólico das brácteas.



Fonte: Autora (2018).

Para a obtenção do extrato aquoso do pinhão (EAP) e das brácteas (EAB), foi seguido o protocolo de FREITAS (2015) com modificações. Os pinhões (com casca) e brácteas foram submetidos ao cozimento convencional por 2 horas. Em seguida, a água de fervura do pinhão e das brácteas foi separada do material sólido em funil e posteriormente, evaporada em evaporador rotatório à temperatura de 50° C por 1h (Figura 8). Ao final desse procedimento, foram obtidos os extratos (EAP e EAB), os quais foram estocados em freezer à - 20 °C.

Figura 8. Fluxograma do preparo do extrato aquoso de pinhão e de brácteas.



Fonte: Autora (2018).

### 3.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

A determinação do conteúdo de compostos bioativos e da atividade antioxidante dos extratos foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA) da UFSC – Campus de Curitibaanos.

#### 3.3.1 Fenólicos totais

Para a determinação do conteúdo total de compostos fenólicos totais do EHB e dos extratos aquosos EAB e EAP, foram utilizados o método do Folin-Ciocalteu. O princípio do método se baseia no fato de que em meio alcalino, os fenóis presentes no extrato reduzem a mistura de ácido fosfotúngstico e fosfomolibdico a óxidos de tungstênio e

molibdênio, respectivamente, ambos de cor azul, cuja absorbância é lida em 765nm (SINGLETON; ROSSI, 1965).

O procedimento consistiu em adicionar 100 µL de extrato diluído a 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Essa mistura foi agitada brevemente em vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado 1 mL de solução 10% de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Os tubos contendo esse meio de reação permaneceram envoltos por papel alumínio e deixados em repouso por 90 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A concentração foi determinada utilizando uma curva padrão de ácido gálico. Cada experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes, em mg de equivalente de ácido gálico (EAG).g<sup>-1</sup> de extrato (em massa úmida).

### **3.3.2 Flavonoides totais**

A quantificação de flavonoides totais para os extratos EHB, EAB e EAP foi realizada de acordo com Christ e Müller (1960) e Peçkal e Pyrzynska (2014). O princípio do método se baseia na formação de um complexo entre o íon  $\text{Al}^{3+}$  e o grupo carbonílico dos flavonoides. O ensaio consistiu em adicionar 1mL de cada extrato diluído a 0,5 mL da solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10 mM e acetato de sódio 50 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, procedeu-se a leitura em 425 nm. Cada experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes, em mg de quercetina.g<sup>-1</sup> de extrato (em massa úmida), calculados a partir da curva padrão de quercetina.

## **3.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

### **3.4.1 Perfil cromatográfico dos extratos**

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI) do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Campus de Curitibanos. A metodologia utilizada foi adaptada de Natividade et al. (2013) e aplicada em um instrumento Agilent Infinity 1260 equipado com bomba quaternária, compartimento de coluna termostaticado, amostrador automático e detectores de fluorescência (FLD) e UV-Vis (DAD).

Para a separação cromatográfica e comparação entre os extratos EAB e EAP, as amostras foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de 1000 ppm e para o EHB, na concentração de 100 ppm. Em seguida, as amostras foram filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ) e 10  $\mu\text{L}$  foram injetados em coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 X 150mm X 3,5 $\mu\text{m}$ ) da Agilent precedida por uma pré-coluna Eclipse Plus C18 (4,6 X 12,5mm X 5 $\mu\text{m}$ ). Separação com gradiente de solvente foi realizada utilizando 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em água (solvente B) de acordo com o programa apresentado na tabela 2. Para todas as análises, foi utilizado um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Tabela 1: Gradiente de solventes para a separação cromatográfica.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0	100
10	7	93
20	10	90
30	12	88
40	23	77
45	35	65
55	100	0
60	0	100
70	0	100

Fonte: Autora (2018).

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

#### 3.5.1 Potencial antioxidante redutor de ferro

O teste do potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP) nos extratos de brácteas e pinhão foi realizado de acordo com o método modificado de Benzie e Strain (1996). Este método baseia-se na redução do íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por moléculas antioxidantes presentes nos extratos e subsequente formação de um complexo corado entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e o composto 2,4,6-Tris (2- piridil) - s - triazina (TPTZ). Previamente ao ensaio, uma solução de cada um dos três extratos com concentração inicial de 50 mg/mL foi preparada e posteriormente diluída de forma a obter seis diferentes concentrações (10, 20, 40, 80, 160 e 320  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ). Para o extrato hidroalcoólico, a solução mãe foi

preparada em solução hidroalcoólica 70% e para os extratos aquosos, as soluções iniciais foram preparadas em água ultrapura (Milli-Q). Alíquotas de cada uma das seis diluições de cada extrato foram adicionadas a um meio reacional contendo TPTZ 10 mM (previamente preparado em HCl 40 mM), cloreto de ferro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM e tampão acetato 0,3 M (pH 3,6). Após a incubação por 15 min a 37°C, a absorbância do complexo azul escuro formado entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e o TPTZ foi registrada em 593 nm. Brancos contendo extrato, mas sem TPTZ, foram também preparados a fim de determinar possíveis absorções diretas dos compostos presentes no extrato no comprimento de onda utilizado. Em seguida, a absorbância dos extratos na presença de TPTZ em 593 nm foi subtraída daquela obtida na ausência do TPTZ. Uma curva de Trolox ( $1,25 - 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, também foi preparada. Cada experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes em  $\mu\text{g}$  de equivalente de Trolox.g-1 de extrato (em massa úmida).

### 3.5.2 Remoção do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

A capacidade antioxidante de remoção do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) dos extratos de brácteas e pinhão foi determinada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Nesse método, avalia-se a capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH, formando o radical difenil-picril-hidrazina. Essa redução é percebida pela conversão da coloração púrpura do DPPH em coloração amarela, cuja diminuição da absorbância é avaliada em 517 nm. Assim, seis diferentes concentrações (10, 20, 40, 80, 160 e  $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de cada extrato foram misturadas com uma solução metanólica de DPPH. O potencial antioxidante dos extratos foi determinado após 24 h de incubação dos extratos com a solução metanólica de DPPH ao abrigo da luz e o resultado foi expresso em percentual da atividade sequestrante do DPPH, a qual foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs extrato}) / (\text{Abs controle})] \times 100 \quad (1)$$

Posteriormente, a concentração de cada extrato capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CE50) foi calculada por regressão não linear usando GraphPad Prisma versão 6.0 (La Jolla CA, USA). Cada experimento foi realizado em duplicata e os

resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes.

### 3.5.3 Proteção contra a oxidação da glutatona

A capacidade dos extratos EAB, EAP e EHB em prevenir a oxidação da glutatona (GSH), foram avaliadas na presença do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como agente indutor da oxidação da GSH. O fundamento do método consiste na reação do grupamento sulfidril (-SH) da GSH com o reagente de Ellman (DTNB ou ácido 5,5'-ditio- bis-2- nitrobenzóico), formando um ânion tiolato (TNB- ou ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) de coloração amarela, mensurável espectrofotometricamente em 412 nm. A formação de TNB- é diretamente proporcional à concentração de GSH na amostra (ELLMAN, 1959). Assim, uma solução de GSH foi adicionada a uma mistura reacional contendo tampão fosfato de potássio (pH 6,8), diferentes concentrações dos extratos (10, 20 40, 80, 160 e 320  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e  $H_2O_2$  (7,8 mM) a 37° C e incubada por 30 minutos. A oxidação da GSH percebida pela diminuição da absorbância foi medida em espectrofotômetro em 412 nm.

Tubos controles contendo extratos (em cada uma das seis concentrações) sem GSH foram avaliados para verificar uma possível absorbância do extrato *per se* no comprimento de onda usado para avaliar a oxidação do GSH (412 nm). O ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos independentes, e o os resultados foram expressos como % de grupos sulfidrilas remanescentes da GSH.

### 3.5.4 Atividade removedora do radical hidroxila

Este método é baseado na capacidade de extrato em eliminar o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e assim, proteger contra a oxidação da desoxirribose induzida por este radical. No meio reacional, o radical  $\cdot\text{OH}$  é produzido através da reação de Fenton, que consiste na redução do  $H_2O_2$  (10 mM) ao radical  $\cdot\text{OH}$  pelo  $\text{Fe}^{2+}$  (HALLIWEL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Por sua vez, o radical  $\cdot\text{OH}$  formado oxida a estrutura química da desóxirribose formando o produto malondialdeído (MDA) e esse reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% formando um complexo MDA-TBA de coloração rosa. A proteção fornecida pelos extratos diluídos (10, 20, 40 80, 160 e 320  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi avaliada pela medida da absorbância desse complexo em 532 nm em um espectrofotômetro. A

capacidade em remover o radical  $\bullet\text{OH}$  foi determinada pelo cálculo da porcentagem de inibição da oxidação da desoxirribose, calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de eliminação (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2)] \times 100/A_0 \quad (2)$$

Sendo,  $A_0$  é a absorbância do controle sem o extrato,  $A_1$  é a absorbância após adicionar desoxirribose mais o extrato e  $A_2$  é a absorbância do extrato na ausência da desoxirribose. Cada experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes, como % de eliminação do radical  $\bullet\text{OH}$ .

### 3.5.5 Atividade removedora do radical superóxido

A capacidade dos extratos de brácteas e pinhões em remover o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (atividade tipo SOD) foi avaliada de acordo com o método descrito por Misra e Fridovich (1972). O princípio do método se baseia na autooxidação da epinefrina a adrenocromo mediada pela formação dos radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em meio alcalino. Diferentes concentrações dos extratos diluídos foram adicionados a um meio reacional contendo 50 mM de tampão glicina pH 10,2 e epinefrina 1 mM a 30°C. O aumento da absorbância em decorrência da formação do adrenocromo foi monitorado em 480 nm durante 5 minutos e posteriormente utilizado para determinar o cálculo da concentração de cada extrato que inibe 50% da oxidação da epinefrina (CI50) (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Os experimentos foram realizados em duplicatas e expressos como a média de três experimentos independentes.

## 3.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

### 3.6.1 Obtenção dos fungos

Os ensaios foram realizados com fungos de solo, cujas espécies utilizadas foram *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* e *S. cepivorum*. Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia da UFSC, Campus de Curitibanos. Os fungos foram obtidos da micoteca, e após a obtenção dos isolados, os mesmos foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Aos 3 dias de idade, os fungos foram repicados para o centro da placa de Petri, para observar o efeito dos extratos sobre o crescimento micelial de cada fitopatógeno em meio BDA. O ensaio consistiu em adicionar os extratos em diferentes concentrações (0, 80, 160, 320 e 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ao meio de cultura BDA líquido. Em seguida, essas misturas foram autoclavadas (temperatura de 120°C, durante 20 minutos) e distribuídas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, com volume total de 15 mL por placa.

A testemunha foi realizada apenas com o meio BDA. Em todos os tratamentos e testemunha foi adicionado o antibiótico estreptomicina a 1%. Após a solidificação do meio BDA com cada extrato, foi adicionado ao centro da cada placa, um disco de meio de cultura BDA com 5 mm de diâmetro, contendo micélio de *S. sclerotiorum* ou de *S. rolfsii* ou de *S. cepivorum* previamente cultivados em meio BDA e mantidos a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As placas foram vedadas com parafilm e acondicionadas em câmaras de crescimento (estufa BOD), à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas 4 repetições para cada tratamento com os 3 fungos.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas duas vezes por dia de 12 em 12 horas, através da medição diametralmente opostas, iniciando-se 12 horas após a instalação do experimento até que o tratamento controle crescesse por todo o diâmetro da placa. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial foi utilizada a fórmula descrita por Bastos (1997), a qual é representada a seguir:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Cresc. testemunha} - \text{Cresc. tratamento}}{\text{Cresc. Testemunha}} \times 100 \quad (3)$$

Em que, cresc.testemunha = crescimento micelial da testemunha (cm) e cresc.tratamento = crescimento micelial dos tratamentos (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 3 x 5, ou seja, utilizando três extratos diferentes (EHB, EAB e EAP) com cinco concentrações crescentes (0, 80 160 e 320 e 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de cada e quatro repetições. Cada repetição foi constituída por 1 placa de Petri.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir da quantificação de fenólicos e flavonoides, bem como da avaliação da atividade antioxidante foram analisados por Teste t de Student ou por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados da atividade antifúngica também foram submetidos à ANOVA, e em seguida, à análise de regressão para as concentrações de extratos a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

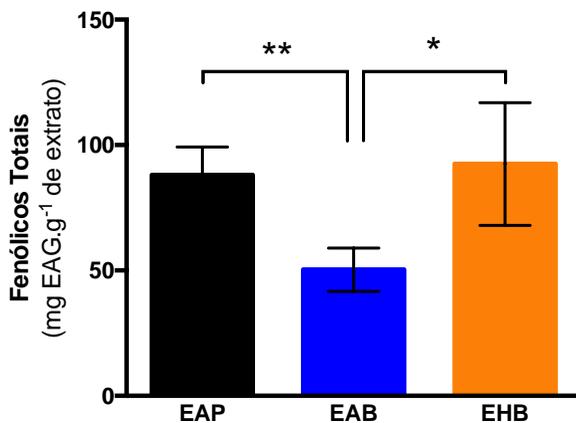
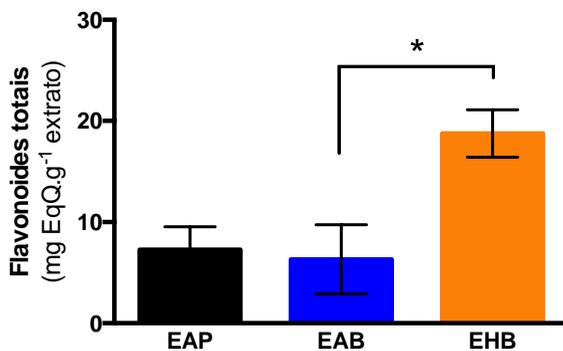
### 4.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os compostos fenólicos em extratos vegetais podem apresentar propriedades biológicas que são benéficas tanto para a saúde humana, quanto ambiental (SOARES, 2002; SMID; GORRIS, 1999). Neste contexto, a investigação dos teores e a identificação de compostos bioativos na *A. angustifolia* é parte importante dos estudos que visam elucidar o potencial biológico dessa espécie nativa, pois as atividades avaliadas podem ser atribuídas a uma ou mais classes de compostos bioativos que fazem parte da sua composição fitoquímica (YAMAMOTO et al., 2004).

No presente estudo, observou-se que o extrato hidroalcoólico de brácteas (EHB) apresentou maior teor de compostos fenólicos totais comparado ao respectivo extrato aquoso (EAB) ( $92,45 \pm 14,13$  versus  $50,31 \pm 4,99$  mg EAG.g<sup>-1</sup>extrato,  $p=0,0482$ ), revelando-se, portanto, um efeito positivo do solvente hidroalcoólico sobre a extração de compostos fenólicos das brácteas. Quando comparamos partes diferentes (casca do pinhão e brácteas) ambas extraídas com solvente aquoso, observa-se que o extrato das cascas do pinhão (EAP) apresentou maior teor de compostos fenólicos em relação ao extrato das brácteas (EAB) ( $88,03 \pm 6,47$  versus  $50,31 \pm 4,99$  mg EAG.g<sup>-1</sup>extrato,  $p=0,0099$ ) (Figura 9 A).

De forma semelhante, o teor de flavonoides também foi maior ( $p=0,04$ ) para o EHB em relação ao EAB ( $18,77 \pm 2,35$  mg versus  $6,32 \pm 3,42$  mg EqQ.g<sup>-1</sup> extrato, respectivamente) (Figura 9 B), o que pode indicar uma contribuição dos flavonoides para o maior teor de fenólicos totais no EHB em relação ao EAB (Figura 9 A), corroborando também o solvente hidroalcoólico como o melhor solvente para a extração de flavonoides das brácteas de araucária. De fato, o uso de um solvente hidroalcoólico parece proporcionar uma maior extração desses compostos dos extratos vegetais (SALDANHA, 2005). Não houve diferenças no teor de flavonoides entre os extratos aquosos EAP e EAB, indicando portanto, que o teor desses compostos é semelhante entre essas diferentes partes da araucária (Figura 9 B). Portanto, é provável que outras classes de compostos fenólicos que não os flavonoides, tenham contribuído para o maior teor de fenólicos totais no EAP em relação ao EAB (Figura 9 A).

Figura 9 - Quantificação de Compostos Bioativos. (A) Fenólicos totais e (B) Flavonoides nos extratos EAP, EAB e EHB de *A. angustifolia*. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (Teste t Student).

**A****B**

## 4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE BRÁCTEAS E DE PINHÃO.

Com base nos resultados para o teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos aquosos das brácteas e do pinhão, foi realizada a comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos EAB e EAP. A comparação entre os extratos foi realizada utilizando a área dos picos majoritários com absorção em 276 nm, correspondente à absorção de substâncias fenólicas com esqueleto tipo ácido benzoico (Figura 10 e Tabela 2).

Para os compostos que absorvem nesse comprimento de onda, observa-se que o perfil cromatográfico dos dois extratos é muito semelhante. Porém, ocorre uma diferença significativa no teor dos componentes com destaque para as substâncias referentes aos picos 1 e 12, os quais aparecem em quantidades significativamente diferentes entre os extratos EAB e EAP. Quando comparamos a intensidade total dos componentes majoritários selecionados, observa-se uma quantidade muito superior de substâncias que absorvem em 276 nm, para o EAP (Tabela 2). Uma vez que a absorção em 276 nm não representa todos os compostos fenólicos existentes no extrato, esta comparação também foi realizada nos comprimentos de onda 320 nm, para observação de ácidos cinâmicos, e 380 nm, para observação de flavonas e flavonoides (dados não mostrados). Para todos os comprimentos de onda, foi observado um maior teor de compostos fenólicos para o extrato aquoso do pinhão (EAP). Esses resultados fortalecem os dados obtidos nos ensaios para fenólicos totais (Figura 9 A), onde o EAP também mostrou maior teor de compostos fenólicos em relação ao EAB (Figura 9).

Nossos resultados estão de acordo com Santos et al. (2018), que demonstrou que a casca do pinhão é uma importante fonte de compostos fenólicos, tendo identificado nesse material, o ácido protocatecuico (da classe dos ácidos benzóicos) e o ácido ferúlico (da classe dos ácidos cinâmicos), além dos flavonoides quercetina-3-O-glicosídeo, epicatequina, eriodictiol e prodelfinidina B3. Nas brácteas, já foram relatados como parte da composição de *A. angustifolia*, os flavonoides catequina, epicatequina, rutina, apigenina e quercetina (MICHELON et al. 2012; SOUZA et al., 2014).

Figura 10. Comparação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 276 nm entre os extratos EAB e EAP. Os cromatogramas estão em sobreposição, sendo o EAB destacado em azul e o EAP, em verde. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150mm x3,5µm), precedida por pré-coluna Eclipse Plus C18 (4,6 x 12,5mm x 5µm), fase móvel A (acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico) e fase móvel B (água acidificada com 0,1% de ácido fórmico) em corrida por gradiente. Condições cromatográficas: vazão 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 10 µL.

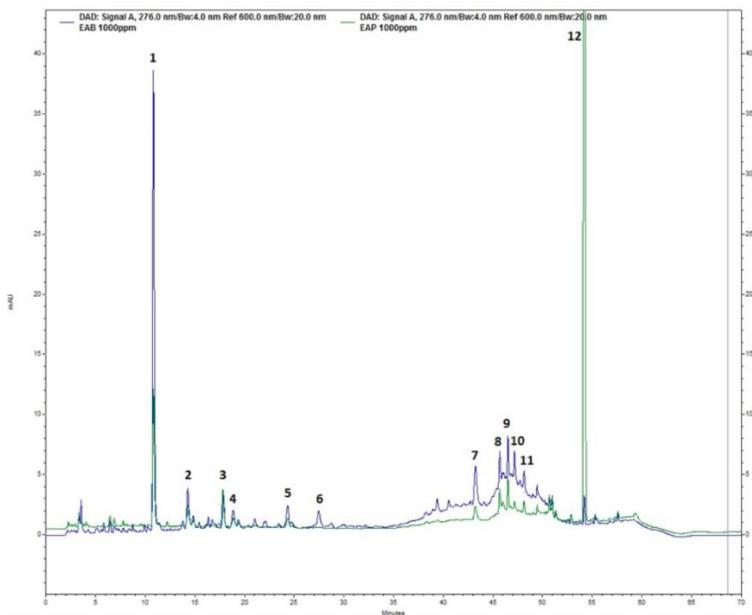


Tabela 2. Área e a porcentagem relativa dos componentes dos extratos EAB e EAP. A área está relacionada à quantidade de cada componente fenólico que tem absorção em 276 nm.

Pico	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)		% relativa	
		EAB	EAP	EAB	EAP
<b>1</b>	10,827	54.899.810	16.186.008	57,88	3,32
<b>2</b>	14,280	6.144.933	3.117.099	6,48	0,64
<b>3</b>	17,880	4.380.753	5.507.062	4,62	1,13
<b>4</b>	18,860	3.066.212	1.487.048	3,23	0,31
<b>5</b>	24,333	3.174.507	1.463.681	3,35	0,30
<b>6</b>	27,467	2.868.625	250.557	3,02	0,05
<b>7</b>	43,240	7.245.977	2.657.661	7,64	0,55
<b>8</b>	45,680	2.983.032	1.835.265	3,14	0,38
<b>9</b>	46,500	3.161.186	2.640.131	3,33	0,54
<b>10</b>	47,167	2.669.276	892.837	2,81	0,18
<b>11</b>	48,140	1.676.784	1.157.802	1,77	0,24
<b>12</b>	54,200	2.587.433	450.029.594	2,73	92,37
<b>Total</b>		<b>94.858.528</b>	<b>487.224.745</b>	<b>100</b>	<b>100</b>



Tabela 3. Área e a porcentagem relativa dos componentes do extrato EHB. A área está relacionada à quantidade de cada componente fenólico que tem absorção em 276 nm.

<b>Pico</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Área (mAU)</b>	<b>% relativa</b>
<b>1</b>	10,840	22.669.505	9,33
<b>2</b>	14,293	2.178.315	0,9
<b>3</b>	14,853	1.879.192	0,77
<b>4</b>	16,767	657.392	0,27
<b>5</b>	17,900	972.744	0,4
<b>6</b>	18,913	2.413.355	0,99
<b>7</b>	24,320	984.859	0,41
<b>8</b>	24,787	1.845.941	0,76
<b>9</b>	27,567	3.178.342	1,31
<b>10</b>	29,847	1.521.500	0,63
<b>11</b>	39,427	3.055.424	1,26
<b>12</b>	40,573	3.048.290	1,26
<b>13</b>	41,260	1.406.218	0,58
<b>14</b>	43,240	3.616.236	1,49
<b>15</b>	45,647	6.197.155	2,55
<b>16</b>	46,487	4.515.345	1,86
<b>17</b>	47,140	6.627.938	2,73
<b>18</b>	48,107	3.755.617	1,55
<b>19</b>	48,673	12.032.965	4,95
<b>20</b>	50,640	15.794.828	6,5
<b>21</b>	50,980	6.030.759	2,48
<b>22</b>	51,293	11.831.409	4,87
<b>23</b>	51,933	7.152.212	2,94

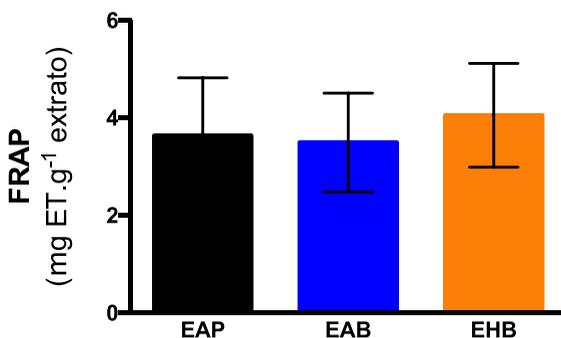
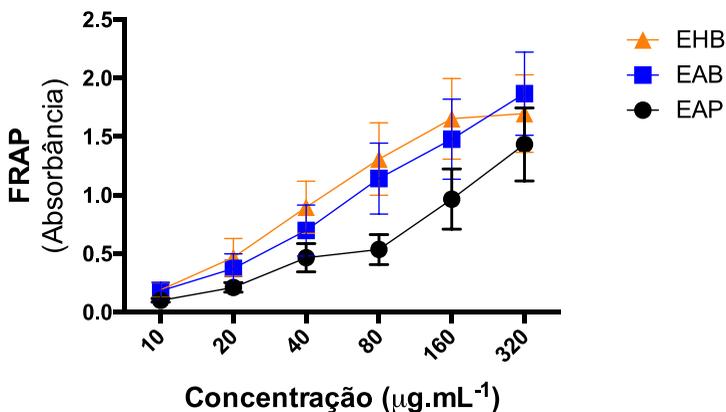
<b>24</b>	52,233	13.485.332	5,55
<b>25</b>	52,567	13.248.308	5,45
<b>26</b>	52,913	5.820.701	2,4
<b>27</b>	53,673	49.224.278	20,27
<b>28</b>	53,960	13.785.297	5,68
<b>29</b>	55,087	2.690.301	1,11
<b>30</b>	55,627	3.764.264	1,55
<b>31</b>	55,947	6.018.441	2,48
<b>32</b>	56,987	6.154.982	2,53
<b>33</b>	57,627	5.326.046	2,19
<b>Total</b>		242.883.491	100.00

### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é uma importante ferramenta na elucidação do potencial antioxidante ou pró-oxidante de extratos vegetais e compostos isolados. Utilizamos neste estudo, os métodos de FRAP, remoção do radical DPPH, remoção do radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ), remoção do radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e proteção contra a oxidação da GSH.

O método de FRAP avalia a habilidade dos compostos antioxidantes em transferir elétron e reduzir o íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) a íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) *in vitro*. Consequentemente, essa habilidade redutora pode refletir a capacidade do antioxidante em doar elétrons para ER, estabilizando-as às formas não reativas (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados da avaliação do potencial redutor (FRAP) dos extratos de *A. angustifolia* estão demonstrados na figura 12 (A e B). Na figura 12 A é demonstrado o aumento da absorbância devido à formação do complexo  $Fe-TPTZ^{2+}$  em 593 nm em função do aumento da concentração de cada extrato (de 10 a 320  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ). Foram plotadas neste gráfico, somente as concentrações cujas absorbâncias estão dentro da faixa de linearidade da curva padrão de Trolox ( $y = 26,706x + 0,2083, R^2 = 0,9043$ ). A faixa de concentração desta curva (1,25 a 80  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) resultou na faixa de absorbância média de 0 a 2,15. A análise dos dados por ANOVA de duas vias revelou que as maiores absorbâncias devido à formação do complexo  $Fe-TPTZ^{2+}$  ocorreram a partir da concentração de 40  $\mu g \cdot mL^{-1}$  para o EAB e EHB, enquanto que não houve diferença nas absorbâncias conforme o aumento da concentração do extrato para o EAP (Figura 12 A). Comparando o potencial redutor expresso em  $mg \cdot ET \cdot g^{-1}$  de extrato, observa-se que não houve diferença entre os extratos aquosos EAB e EAP, nem entre os extratos aquosos e hidroalcoólicos de brácteas (EAB x EHB) (Figura 12 B).

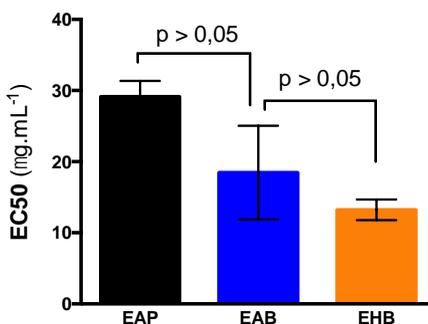
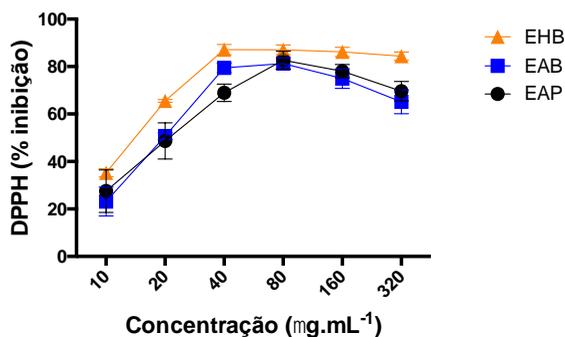
Figura 12. Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP) nos extratos de *A. angustifolia*. Em (A), vê-se a absorbância obtida pelo método de FRAP em função da concentração do extrato e em (B) a atividade obtida por FRAP na concentração de  $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada extrato. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P. de três experimentos independentes. Em (A), dados foram analisados por ANOVA de 2 vias/Tukey e em (B) por Teste t Student.



O método de remoção do radical DPPH avalia a capacidade antioxidante de um composto ou de extratos através de dois

mecanismos: 1- pela transferência de elétron e/ou 2- pela transferência de hidrogênio ao radical DPPH, estabilizando-o à sua forma não reativa (HUANG; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Assim como para os resultados obtidos no ensaio de FRAP, não houve diferença nessa atividade entre os extratos aquosos (EAP e EAB), nem entre os extratos das brácteas (EAB e EHB) quando presentes nas mesmas concentrações (Figura 13 A). Da mesma forma, a CE50 de cada extrato (concentração de extrato que reduz em 50% o radical DPPH), também não diferiu entre os extratos aquosos (EAB e EAP) e entre os extratos de brácteas (EAB e EHB) (Figura 13 B).

Figura. 13. Atividade sequestrante do radical DPPH (A) e a determinação da CE50 (B). Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P. de três experimentos independentes. Em (A), dados foram analisados por ANOVA de 2 vias/Tukey e em (B) por Teste t Student.



A ANOVA de duas vias revelou que a habilidade de cada extrato em remover o radical DPPH aumentou com o aumento da concentração do extrato até  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (para o EAP) ou até  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (para EAB e EHB), havendo posteriormente uma queda nessa atividade a partir de  $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (para EAP e EAB) e de  $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o EHB (Figura 13 A). Portanto, a habilidade dos extratos em remover este radical parece obedecer a uma estreita faixa de concentração, acima da qual começam a perder esta propriedade.

A partir desses resultados, conclui-se que tanto a capacidade redutora como a habilidade em remover o radical DPPH não difere entre os extratos. Esses dados estão de acordo com o fato de que tanto FRAP quanto DPPH avaliam mecanismos de atividade antioxidante similares, e por isso, é comum encontrar correlações entre os resultados desses dois métodos (MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011).

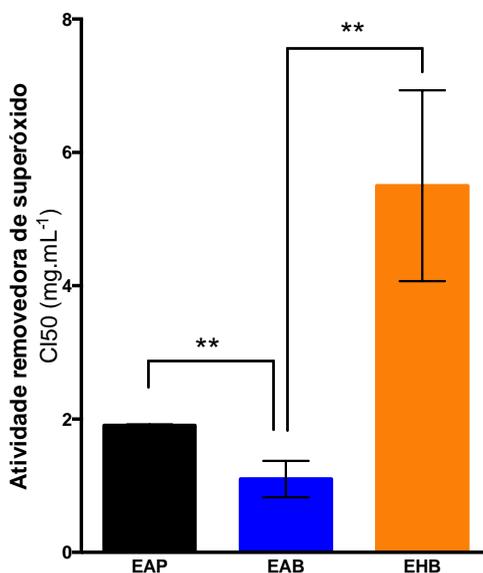
Essa ausência de diferença na atividade antioxidante entre os extratos parece não acompanhar os dados dos teores de compostos bioativos, uma vez que o EHB apresentou maiores teores de fenólicos totais e de flavonoides em relação ao EAB, mas isso não impactou no aumento da atividade antioxidante em relação ao seu respectivo extrato aquoso (EAB). Uma vez que extratos de *A. angustifolia* são misturas extremamente complexas de vários compostos bioativos (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, monoterpenos, etc), outros compostos além dos flavonoides podem estar relacionados aos resultados obtidos para a atividade antioxidante. Não se pode descartar que outros compostos que não pertençam aos compostos fenólicos (açúcares, proteínas, tióis, ácido ascórbico, Fe (II), ácidos orgânicos, etc.) possam estar superestimando a dosagem dos compostos fenólicos pelo método do Folin-Ciocalteu nos extratos em estudo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Portanto, uma correlação entre esses teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante aqui observada poderia não ser confiável.

Além do teste de remoção do radical DPPH (que consiste em um radical sintético), este estudo também avaliou a capacidade dos extratos de *A. angustifolia* em remover duas EROs de importância nos processos oxidativos em organismos vivos: o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ).

O ensaio de remoção do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  representa uma atividade tipo SOD, uma vez que essa remoção é avaliada no mesmo meio de incubação utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD. Conforme demonstrado na Figura 14, todos os extratos apresentaram atividade removedora de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , com menor atividade para o EHB, que apresentou o

maior valor médio de CI50 (concentração que inibe 50% da oxidação da epinefrina no meio de incubação alcalino). Assim, o valor de CI50 para o EHB foi de  $5,50 \pm 0,86 \text{ mg.mL}^{-1}$  em comparação com  $1,1 \pm 0,16$  e  $1,91 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  para o EAP e EAB, respectivamente. Portanto, observa-se que os extratos aquosos (EAP e EAB) apresentaram maior atividade removedora do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em relação ao (EHB) .

Figura 14. Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *A. angustifolia*, demonstrada como atividade removedora do ânion radical superóxido. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P. de três experimentos independentes.  $**p < 0,01$  (Teste t Student).



Extratos vegetais com habilidade em remover o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  podem desempenhar importante papel no bloqueio das reações celulares que geram EROs em cadeia. Nas células, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se converte em  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação enzimática, o qual posteriormente, origina o radical  $\bullet\text{OH}$ , considerado o mais reativo entre as EROs. Assim, a remoção do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se constitui em uma importante etapa na prevenção dos danos oxidativos e demais efeitos relacionados ao radical  $\bullet\text{OH}$  (peroxidação lipídica, danos ao DNA, câncer, etc.) (ZAMPELAS; MICHA, 2015). Entre os compostos bioativos já encontrados em outros estudos nas brácteas e

sementes de *A. angustifolia*, alguns flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina) e ácidos fenólicos são descritos entre os compostos responsáveis por remover essa ERO *in vitro* (ZAMPELAS; MICHA, 2015).

Nossos resultados estão de acordo com Souza et al. (2014), que também demonstrou que um extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* apresenta atividade removedora dos radicais DPPH e  $O_2^{\bullet-}$ , porém com maior valor de CI50 ( $0,146 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) no ensaio do DPPH em comparação ao encontrado em nosso estudo ( $18,46 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Essa diferença pode estar associada aos diferentes métodos de preparo dos extratos aquosos observados entre os dois estudos, sendo que o nosso utilizou maior tempo de cozimento (2h) em comparação a 15 min no estudo de Souza et al. (2014), o que pode ter resultado em maior extração dos compostos bioativos envolvidos na remoção do DPPH em nosso estudo.

Apesar da atividade antioxidante demonstrada por três diferentes ensaios, os três extratos de araucária não apresentaram atividade de remoção do radical  $\bullet\text{OH}$ , nem capacidade em proteger a GSH contra a oxidação induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (dados não mostrados). Esse fato pode ser devido à ausência ou às baixas concentrações nesses extratos de compostos capazes de desempenhar essas propriedades, ou aos métodos de extração, que podem não ter efetivamente recuperado esses compostos de suas fontes (cascas de pinhões e brácteas).

No geral, os resultados da atividade antioxidante *in vitro* não diferiram significativamente entre os extratos de araucária, especialmente nos ensaios de FRAP e DPPH. Os resultados semelhantes entre os extratos aquosos de pinhões e brácteas tanto em relação ao conteúdo de compostos bioativos, quanto à atividade antioxidante indicam que essas duas partes da araucária possuem potencial antioxidante semelhantes. Essa afirmação é corroborada pelo fato de que mesmo que o EAP tenha apresentado uma quantidade muito maior do composto n.12 (Tabela 2) do que o EAB, esse fato não impactou em diferenças na atividade antioxidante entre os dois extratos aquosos.

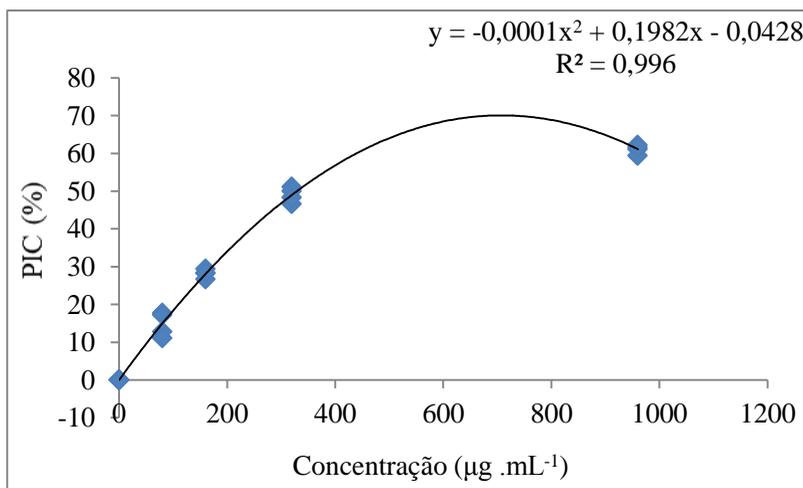
A extração de brácteas com um solvente hidroalcolólico (EHB), embora recupere maior teor de polifenóis totais e de flavonoides, parece não impactar em diferenças na atividade antioxidante em relação ao respectivo extrato aquoso (EAP). Porém, a menor atividade antioxidante desse extrato (EHB) em comparação aos extratos aquosos (EAB e EAP) no ensaio de remoção do  $O_2^{\bullet-}$ , pode ser decorrência de um possível efeito pró-oxidante dos compostos fenólicos (AWAD, 2002), especialmente dos flavonoides, considerando que o teor desses

compostos no EHB foi maior em relação aos extratos aquosos EAP e EAB.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Na figura 15, está demonstrada a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* em função da concentração do EHB. Observa-se que o EHB inibiu o crescimento micelial do fungo em toda a faixa de concentração testada (de 80 a 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), tendo atingido os valores médios de inibição de 49 e 61% nas concentrações de 320 e 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 15. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotium cepivorum* pelo extrato hidroalcoólico de brácteas (EHB). Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade para as concentrações de 80 a 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



Diferente do EHB, o EAB e o EAP exerceram menor efeito inibitório sobre o crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* somente na maior concentração (960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Figuras 16 e 17), indicando, portanto, menor potencial antifúngico para os extratos aquosos. Essa inibição média foi em torno de 29% para o EAB e 20% para o EAP, (Figuras 16 e 17). Na figura 18, é possível observar as diferenças na inibição do crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* na concentração

de  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$  entre os três extratos, com a maior inibição exercida pelo EHB.

Figura 16. Porcentagem de inibição de crescimento micelial do fungo *Sclerotium cepivorum* pelo extrato aquoso de brácteas (EAB). Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade para a concentração  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

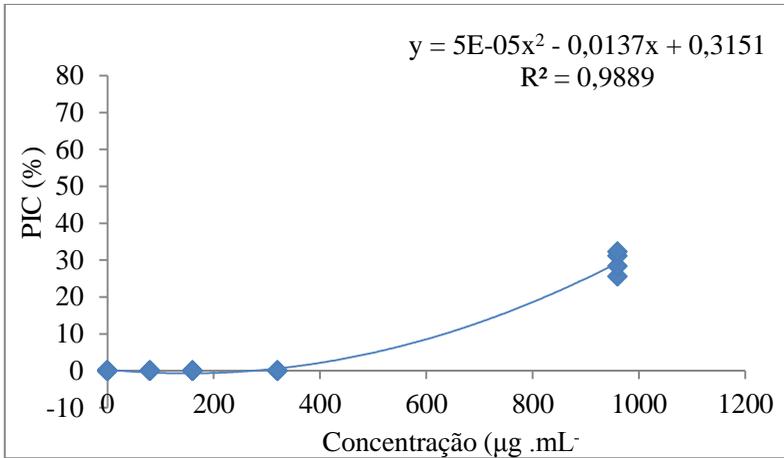


Figura 17. Porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Sclerotium cepivorum* pelo extrato aquoso do pinhão (EAP). Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade, para a concentração de  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

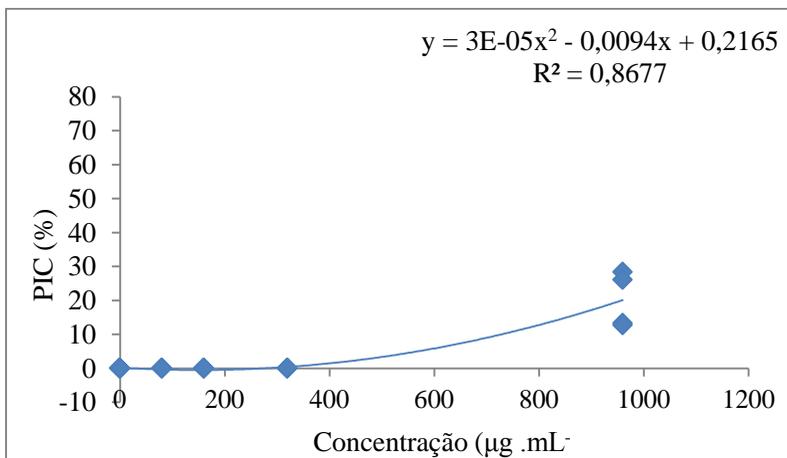
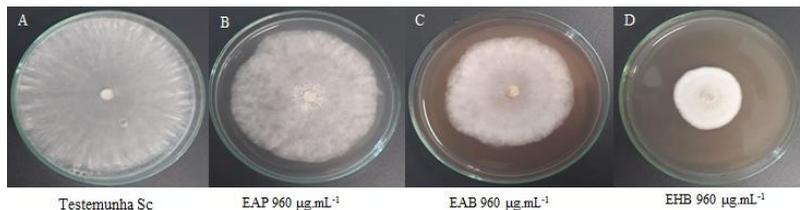


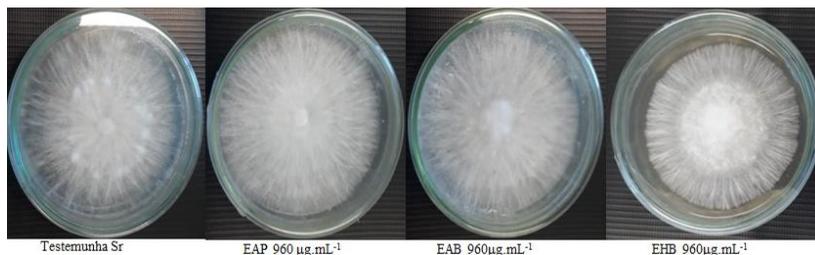
Figura 18. Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial do fungo *Sclerotium cepivorum* na concentração de  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em (A), a testemunha, (B) EAP, (C) EAB e (D) EHB. Sc: *S. cepivorum*



Fonte: Autora (2018).

Diferente dos resultados obtidos para o *S. cepivorum*, os três extratos de araucária não exerceram inibição significativa sobre o crescimento micelial do fungo *S. rolfsii* entre  $80$  e  $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Somente na concentração de  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , obteve-se uma pequena inibição, que não diferiu entre os extratos, e cujas porcentagens médias sobre este fungo foram de  $15,83 \pm 7,97$ ,  $10,97 \pm 5,55$  e  $4,3 \pm 2,16$  % para o EHB, EAB e EAP, respectivamente. Na figura 19, é possível observar as placas com as culturas de *S. rolfsii* incubadas com a maior concentração ( $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de cada um dos três extratos, com uma discreta redução do halo de crescimento sob incubação com o EHB.

Figura 19. Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial do fungo *Sclerotium rolfsii* na concentração de  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em (A), a testemunha, (B) EAP, (C) EAB e (D) EHB. Sr: *S. rolfsii*.



Fonte: Autora (2018)

Nenhum dos três extratos exerceram inibição significativa sobre o crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* (dados não mostrados).

Ainda não existem estudos avaliando a atividade antifúngica da araucária sobre qualquer gênero ou espécie de fungos. No presente estudo, o EHB exerceu inibição sobre o crescimento do fitopatógeno *S. cepivorum* em uma faixa mais ampla de concentração (80 a 960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quando comparado ao seu respectivo extrato aquoso EAB. Esses resultados podem estar associados ao fato de que o solvente hidroalcoólico propicia a extração de compostos mais e menos polares em relação aos solventes aquosos, os quais extraem exclusivamente os compostos mais polares (SALDANHA, 2005). Assim, possivelmente a maior atividade antifúngica do EHB pode estar relacionada à recuperação de compostos que não foram extraídos no EAB, ou foram extraídos em concentrações insuficientes para exercer seu potencial antifúngico. Os maiores teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais no EHB em comparação ao EAB (Figura 9 A e B), reforçam a hipótese da obtenção de maiores teores de compostos com atividade antifúngica nesse extrato.

Estudos indicam que os polifenóis de plantas, especialmente das classes dos taninos, monoterpenos, ácidos fenólicos, ácido ferúlico, flavonoides, flavonol, exercem importante atividade antifúngica contra patógenos humanos, além de fitopatógenos (MIDDLETON; KANDSWAMI, 1986; LOBO et al., 2013). Em concordância com esses estudos, evidências demonstram que as brácteas da araucária também são fontes de monoterpenos, taninos e flavonóis, os quais podem estar associados ao seu potencial de inibição sobre o crescimento do *S. cepivorum* observado no presente estudo. Ainda de acordo com os nossos resultados, os extratos hidroalcoólicos se apresentaram como melhores solventes comparados aos solventes aquosos para a extração dos compostos fenólicos de diferentes partes da araucária (SALDANHA, 2005; VIEIRA et al. 2009).

Comparando os extratos aquosos entre si, observa-se que ambos apresentaram baixo potencial antifúngico, o qual só foi detectado na maior concentração (960  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para ambos contra o fungo fitopatogênico *S. cepivorum* (Figuras 16, 17 e 18). Conforme observamos, os teores de compostos fenólicos totais e a % relativa das áreas dos picos obtidos por HPLC em 276 nm (Figura 10 e Tabela 2) foram maiores no EAP comparados ao EAB. Porém, essa diferença não impactou em maior potencial antifúngico do pinhão em relação às brácteas. Talvez porque o conteúdo de flavonoides, reconhecidos compostos com atividade antifúngica, não tenha variado entre os dois extratos ou ainda, o uso do solvente aquoso para ambas as partes da

araucária não tenha extraído suficientemente os compostos com atividade antifúngica para os fitopatógenos avaliados neste estudo. Todavia, é indispensável considerar que possivelmente outros compostos não relacionados ao grande grupo dos fenólicos também possam ter contribuído para atividade antifúngica observada, sejam de forma isolada ou em sinergismo.

Estudos prévios indicam que os polifenóis em geral (e, portanto, os extratos que os contenham) podem exercer seu potencial antifúngico por inativar sistemas enzimáticos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais das membrana dos microrganismos, tais como a quitina, o ergosterol e proteínas (BIERHALS et al, 2009). Dessa forma, o controle da entrada de nutrientes através da membrana fica prejudicado. Os compostos fenólicos também podem atuar inibindo a síntese de aminoácidos fúngicos, fosfolipídios de membrana, além de interferir no transporte de elétrons da célula (BIERHALS et al., 2009). Evidências indicam que a toxicidade de compostos fenólicos aos microrganismos pode estar relacionada ao número de hidroxilas presentes nos grupos fenólicos, uma vez que o aumento da hidroxilação aumenta a toxicidade (FERREIRA et al., 2006).

Além dos mecanismos supracitados, compostos que induzam o estresse oxidativo em microrganismos também podem contribuir para a inibição do crescimento desses agentes. Flavonoides como quercetina, taxifolina, luteolina, fisetina e muitos outros contendo na estrutura química um elemento tipo catecol (3,4'-di-hidróxi) podem desempenhar um comportamento pró-oxidante em certas condições (AWAD, 2002). Esse comportamento pode estar relacionado à capacidade alquilante e oxidativa dos flavonoides sobre a molécula de DNA, a qual poderia explicar a indução de mutações em *Salmonella typhimurim* (MCGREGOR; JURD, 1978).

Considerando que o extrato EHB apresentou maior teor de flavonoides, e decaimento do seu potencial em remover o radical DPPH na concentração de  $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pode-se sugerir que na concentração mais efetiva da atividade antifúngica ( $960 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), este extrato tenha exercido um efeito pró-oxidante sobre o *S. cepivorum*. Os extratos aquosos EAB e EAP, cujo potencial removedor do radical DPPH decaiu a partir de  $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , também podem ter exercido esse efeito pró-oxidante sobre o *S. cepivorum*, embora com menor intensidade em relação ao EHB, o que pode ser explicado pela menor recuperação de compostos bioativos com propriedades antifúngicas comparada ao EHB.

Com base nesses mecanismos, há a necessidade de estudos posteriores para a investigação dos mecanismos envolvidos na atividade

antifúngica dos extratos de araucária, em especial, do EHB. Além disso, o menor potencial antifúngico dos extratos EHB, EAB e EAP para o fungo *S. rolfsii*, bem como a ausência da atividade antifúngica dos três extratos para o *S. sclerotiorum*, não significa que os mesmos não sejam efetivos contra outras espécies de fungos fitopatogênicos. É importante ressaltar que os extratos foram autoclavados antes da avaliação da sua atividade antifúngica, o que pode ter reduzido o seu potencial antifúngico.

De qualquer forma, a inibição significativa do crescimento micelial do fungo *S. cepivorum* pelo EHB é de suma importância, considerando que esse fitopatógeno é o causador da podridão branca em culturas de alho e cebola, cuja produção tem grande importância na região do município de Curitiba, SC, em especial, a do alho, que provê 76% do total de alho produzido no estado Catarinense (EPAGRI, 2016). Portanto, o potencial desse extrato como forma mais sustentável de combater o *S. cepivorum* e as doenças causadas por este fitopatógeno nas culturas afetadas merece ser mais bem explorado. Neste sentido, estudos avaliando o potencial do EHB em culturas vegetais contaminadas por este fitopatógeno seriam de grande relevância para o contexto agrícola regional.

## 5 CONCLUSÃO

No geral, este trabalho evidenciou pela primeira vez, o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico das brácteas (EHB) de *A. angustifolia*, em especial contra o fitopatógeno *S. cepivorum*. Essa atividade pode estar relacionada ao maior teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais neste extrato em comparação ao seu respectivo extrato aquoso (EAB), cujo potencial antifúngico apresentou-se 2x menor na concentração mais efetiva de ambos ( $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A menor atividade antifúngica do EAB comparado com o EHB indica que a extração utilizando um solvente hidroalcoólico é mais efetiva em recuperar maior teor dos compostos das brácteas que são responsáveis pela atividade antifúngica. Estudos posteriores estão sendo desenvolvidos a fim de identificar os compostos relacionados ao potencial antifúngico do EHB, bem como para investigar os possíveis mecanismos envolvidos.

Por fim, destaca-se a necessidade de pesquisas envolvidas na investigação de outras aplicações para os extratos de araucária tanto na saúde ambiental quanto humana, a fim de agregar valor a essa espécie, bem como à vasta biodiversidade nativa da mesorregião Serra Catarinense.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, A.L. et al. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. **Phaseolicola** **Planta**, v. 19. p. 240-249, 1995.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5<sup>a</sup> ed. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2005.
- ALMEIDA, M.T.R. **Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral**. 2003. Dissertação (Mestre em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/86288>. Acesso em 05 ago. 2018.
- AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. **Biologia**. 2<sup>o</sup> ed, v. 2. Editora Moderna. São Paulo, 2004.
- AMARANTE, C.V.T. et al. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Cienc Rural**, v.37, n. 2, p. 346-351, 2007.
- ANTUNES, T.V.; FREITAS, R.F.; ROYO, V.A. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae). **Rev Univ Vale Rio Verde**, v. 14, n. 1, p. 448-457, 2016.

AWAD, H.M. Studies on the pro-oxidant chemistry of flavonoids. Tese de Doutorado, Wageningen University, Wageningen, Alemanha. 2002. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/29298240.pdf>. Acesso em 20 maio 2019.

Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul, BRDE.  
**Cultivo da *Araucaria angustifolia*: Análise de viabilidade econômico-financeira**: Florianópolis, 2005.

BARBOSA, R. M. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Cienc Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatol Bras**, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p. 1-30, 2010.

BECKER, W. F. Doenças do alho: sintomatologia e controle. Epagri, 53p. Florianópolis, 2004. Disponível em: <http://andorinha.epagri.sc.gov.br/consultaweb/site/busca?b=ad&id=32936&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22BECKER,%20W.%20F.%22&qFacets=autoria:%22BECKER,%20W.%20F.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 07 ago. 2018.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BETTIOL, W. Controle alternativo de doenças de plantas (2006). Disponível em:

<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1026311&biblioteca=vazio&busca=1026311&qFacets=1026311&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso 03 ago. 2017.

BIERHALS, V. S. et al. Total phenolic compounds, antioxidant and antifungal activities of multimixtures enriched by adding microalgae *Spirulina platensis*. **Rev Inst Adolfo Lutz** (Impr.) [online]. v. 68, n.1, p. 42-48, 2009.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Mol Plant Pathol**, v.7, n.1, p.1-16 2006.

BRANCO, C.S.. et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chem Biol Interact**, v. 231, p. 108-118, n.1, 2015.

BRANCO, C.S. et al. Chemical Constituents and Biological Activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **J Org Inorg Chem**. v. 2 n.1, p. 1-10, 2016.

BRANCO, C. et al. Modulation of Mitochondrial and Epigenetic Targets by Polyphenols-rich Extract from *Araucaria angustifolia* in Larynx Carcinoma. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 19. p. 130 – 139, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Sci Technol**, v.28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. PTDRS. Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável. Planalto Catarinense (2010). Disponível em <  
[http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs\\_qua\\_territorio071.pdf](http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs_qua_territorio071.pdf)>. Acesso em 08 ago. 2018.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Ann Inst Super Sanit, Roma**, v. 41, n.1, p.7-16, 2005.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ., p, 640. Brasília-DF. 1994.

CASTILLO, M.F. **Diferentes aspectos fisiológicos en el esturión *Acipenser naccarri*. Estudio comparado con la trucha *Oncorhynchus mykiss***. Tese de Doutorado, Universidad de Granada, Granada, 2008. Disponível em: <https://hera.ugr.es/tesisugr/17491769.pdf> Acesso em: 12 fev. 2019.

CERTI. Fundação Centro de Referência em Tecnologia Inovadora. Diagnóstico das cadeias produtivas do pinhão e da erva-mate. In: **Análise integrada das cadeias produtivas de espécies nativas da floresta ombrófila mista e seu impacto sobre o ecossistema**, v. 1, 2012.

CHRIST, B.; MÜLLER, K.H. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. **Arch Pharm.**, v. 293, Disponível: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ardp.19602931202>. Acesso em: 27 nov. 2018.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Scienc of Food and Agric J**, v.80, p. 1118-1125, 2000.

CORDENUNSI, B. et al. Chemical composition and glyceimic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Agric Food Chem J**, v. 52, n.11, p. 3412-3416, 2004.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: Akoh CC, Min DB, editors. **Food Lipids**. 2nd ed. New York, p. 517–542, 2002.

DEMANT, C.A.R. Mofo branco e seu manejo no Oeste baiano. Boletim Passarela da Soja. **Fundação-BA**, n. 2, mar, 2010.  
Disponível em: [https://fundacaoba.com.br/wp-content/uploads/2016/12/revista\\_passarela\\_da\\_soja\\_2010.pdf](https://fundacaoba.com.br/wp-content/uploads/2016/12/revista_passarela_da_soja_2010.pdf).  
Acesso em: 27 nov. 2018.

DINAKAR, C. et al. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Scienc**, v.182, p. 29-41, 2012.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70-77, 1959.

EPAGRI, Síntese anual da agricultura em Santa Catarina 2016-2017. Disponível em:  
[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/Sintese-Anual-da-Agricultura-SC\\_2016\\_17.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese-Anual-da-Agricultura-SC_2016_17.pdf). Acesso em: 30 jul. 17.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2º ed. Caxias do Sul, 2004.

FELDMANN, K. A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Cur Opin Plan Biol**, v.4, n. 2, p. 162-167, 2001.

FERREIRA ET AL. Antifungal and multidrug resistance modulatory effects of diterpenic and phenolic compounds **Planta Med**, v. 23, p. 72-77, 2006.

FONSECA, F. N. et al. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochem**, v.55, n. 6, p.575- 80, 2000.

FREITAS, A. et al. O. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Ethnopharmacol J**, v, 126, ed 3, p. 512–517, 2009.

FREITAS, T. B. **Production and characterization of zein films with extract and shell of pine seeds**. 34 f. Trabalho de conclusão de curso – Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR), Campo Mourão/PR, 2015.

FRIDOVICH, I. **Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen?** Duke University Medical Center, v. 893, p. 13-8, 1999.

GAMA, T. M. M. T. B. **Estudo comparativo dos aspectos físico-químicos do pinhão nativo e do pinhão proveniente de processos de polinização de *Araucaria angustifolia* e da influencia do tratamento térmico**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), UFPR, Curitiba/PR, 2006.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chem**, v. 119, p.731-737, 2010.

GUINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2<sup>o</sup> ed, Embrapa Meio Ambiente, p. 78, 2000.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol**. v. 33, n. 7, p. 601-617, Londres, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radic in Biol and Med**. 4 th edition. Oxford, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTRIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay determination of rate

constants for reactions of hydroxyl radicals. **Biochem J**, v. 165, n. 1, 1987.

HARPER, G. E: **Aspects of the biology on the sclerotia of *Sclerotium cepivorum***. 2001. 140 f. Tese (Doutor em Filosofia) - Lincoln University. Canterbury Disponível em: <<https://researcharchive.lincoln.ac.nz/handle/10182/1703>>. Acesso 17 jul. 2018.

HORBACH, R.et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Plant Physiol J**, v.168, n.1, p.51–62, 2011.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Disponível em:<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/panorama>>.Acesso em: 17 ago. 2018.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, 4ª edição. Editora Ceres São Paulo, 2005.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.129-150, 2010.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v. 50, n. 2, p. 213-8, 1999.

KOEHNLEIN, E.A.K. et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African J Food Scienc**, v. 6, p. 512-517, 2012.

KRIS-ETHERTON, P et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am J Med**, v. 113, n, 9 p, 71-88, 2002.

KRUG, C.; SANTOS. I. O Uso de Diferentes Métodos para Amostragem da Fauna de Abelhas (Hymenoptera: Apoidea), um Estudo em Floresta Ombrófila Mista em Santa Catarina. **Neotrop Entomol**, v. 37, p. 265-278, 2008.

LEITE, D. M.; JONG, E.V.; NOREÑ, C. P. Z.; BRANDELLI, A. Nutritional evaluation of *Araucaria angustifolia* seed flour as a protein complement for growing rats. **Scien Food Agric J**, v. 88, p. 1166–1171, 2008.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutri**, v. 134. n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LOBO, M. A. et al. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis* pers (*Typhaceae*). **Unisanta BioScien**, v. 2 n. 1, p. 42-51, 2013.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p. 45-64, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3º ed. Nova Odessa/SP, 1992.

MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá.** 1995 Dissertação (Mestre ). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.

MARTINS, R. D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Rev Bras Plant Med**, v. 12, p. 380-397, 2008.

MACGREGOR, J.T.; JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Mutat. Res**, v. 54, p. 297, 1978.

MELO, D. M et al. Produtividade De Híbridos De Melão Rendilhado Em Diferentes Substratos Alternativos. **Hort Bra**, v. 27, n. 2, S208-S213, 2008.

MICHELON, F. et al. *Araucaria Angustifolia*: a Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Cur Nutri Food Scienc**, v. 8, p. 155–159, 2012.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The Impact of Plant Flavonoids in Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer. In: Harbone, J.B., Ed., **The Flavonoids: Advances in Research Since**, Chapman & Hall, London, p. 619-652, 1986.

MIGUEL, M.; CORDERO, M. D. **Oxidative Therapy Against Cancer.** In: **Oxidative Stress and Diseases.** Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 3170- 3175, 1972.

MONCALVO, J. M. Evaluation of fungal biological diversity in the tropics: systematics perspectives. p.1-27. In: JANARDHANAN, K. K.; RAJENDRAN, C.; NATARAJAN, K.; HAWKSWOTH, D. L (eds.). **Tropical Mycology**, v. único, 1997.

MOREIRA, E.A.M.; SHAMI, N.J.I. E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutri**, v. 17, p. 227-236, 2004.

MÜLLER, L.; FROHLICH, K.; BOHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chem**, v. 129, p. 139-148, 2011.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. 2009. Tese (Doutor em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp124098.pdf>. Acesso em: 17 ago 2018.

NATIVIDADE, M. M. P. et al. Análise simultânea de 25 compostos fenólicos em suco de uva para HPLC: Validação de método e caracterização de amostras do Vale do São Francisco. **Rer Microchem**, v. 110, p. 665-674, 2013.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathol**, v. 21, p. 95-99, 1995.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Ann Rev Phytopatol**, v. 30, p. 369-389, 1992.

- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycot J**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2008.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, v. 7, n. 9, 2014.
- PENA JÚNIOR, M.A.G. **Demandas de pesquisa para a Amazônia Legal**. Embrapa Estudos e Capacitação. EMBRAPA, 2011.
- PERES, F.; MOREIRA, JC., orgs. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food SciTechnol**, v. 40, p. 1-11, 2007.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem**, v. 53, n.10, p. 4290-4302, 2005.
- RAJA et al. . Effect of volatile oils in protecting stored *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. **J Stored Prod Res**, v. 37, n. 2, p. 127-132, 2001.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariceae: Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajai, p. 21-24, 1966.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil:** Lunardelli. p, 320, 1979.

REYNERSTON, K. A. et al Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chem**, v. 109, p. 883-889, 2008.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante “in vitro” de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).** 2005. Dissertação (Mestre em Saúde Pública), Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-15042008-104510/es.php>. Acesso em: 10 nov 2018.

SAMANTA et al. impact of tanino acid on the gastrointestinal Microflora Microbial Ecology in health and disease. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 32-34, 2004.

SANTOS. B. A origem e a importância dos insetos como pragas em plantas. Curitiba-PR, 2003. Disponível em: <http://www.bio.ufpr.br/portal/pragasplantas/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Aula-1-Origem-e-import%C3%A2ncia-das-pragas-de-plantas-cultivadas.pdf>. Acesso em 16 de nov, 2018.

SANTOS, G. et al. Anéis de crescimento anual em uma amostra de pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*): Para melhorar a curva de calibração C para o Hemisfério Sul. **Geocronol Quaternária**, v. 25, 2015.

SANTOS, H.K. et al. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coat. **Food Chem**, v. 261, p. 216-223, 2018.

SCHÄFER, W. B.; PROCHNOW, M. **Como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. 1ª Edição: Apremavi, Brasília, 2002.

SCHURT, D. A. **Potencial do isotilcianato e alilo no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/4447>. Acesso 17 ago. 2018.

SECCON, A. **Caracterização da atividade antioxidante e inibidora da tirosinase de substâncias extraídas da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e encapsulação em nanopartículas biodegradáveis**. 2010. Dissertação (Mestre em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, -Florianópolis, 2010. Disponível em: <http://biblioteca.portalbolsasdeestudo.com.br/link/?id=2628896>. Acesso em: 07 ago 2017.

SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração dos seus recursos florestais**. Editora Senac. São Paulo, 2002.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **AJEV**, v.13, p.144–158, 1965.

SMID, E.J.; GORRIS, LGM. Natural antimicrobials for food preservation. **Handbook of Food Preservation** (ed By MS Rahman. Marel Dekker), p. 285-308, 1990.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. et al. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants (Basel)**, v. 3, p. 24–37. 2014.

STEADMAN, J. R.; BOLAND, G. White mold. In: SCHWARTZ, H.F.; et al. Compendium of bean diseases. **Phytopathol Soc.** 2 ed. EUA, 2005.

STEFANELO, M. Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja: Uma doença com importância crescente. Novembro, 2015. Disponível em: <<http://maissoja.com.br/mofo-branco-sclerotinia-sclerotiorum-em-soja-uma-doenca-com-importancia-crescente/>> Acesso em: 03 ago. 2017.

VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev Eletron de Farm**, v. 5, p. 119-130, 2007.

VIEIRA, M. et al. Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo de processamento de erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes. In: International workshop – Advances in Cleaner Production. Anais. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/5b/4/m.%20a.%20vieira%20-%20resumo%20exp%20-%205b-4.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2018.

WOOTTON-BEARD, P.C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Res Int**, v. 44, n. 1, p. 217-224, 2011.

YAMAMOTO, S.; OTTO, A.; SIMONEIT, B. R. T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. **Mass Spectrom J**, v 39, p. 1337–1347, 2004.

YANG, X. B.; WORKENEH, F.; LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Dis**, v. 82, p. 264, 1998.

ZAMBOLIM, L.; JACCOUD FILHO, D. S. Doenças causadas por fungos em alho e cebola. In: ZAMBOLIM, L.; VALE F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas hortaliças**. UFV, v. 1, p. 1-41, 2000.

ZAMPELAS, A.; MICHA, R. **Antioxidants in Health and Disease**.: 1ª Ed Taylor & Francis, New York. 2015.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Agric Food Chem J**, v.49, p. 5165-5170, 2001.